

Marcação intracelular e processo de quantificação por imagem por ressonância magnética utilizando nanopartículas magnéticas de óxido de ferro em células da linhagem C6 de glioma de rato

Intracellular labeling and quantification process by magnetic resonance imaging using iron oxide magnetic nanoparticles in rat C6 glioma cell line

Javier Bustamante Mamani¹, Lorena Favaro Pavon¹, Liza Aya Mabuchi Miyaki², Tatiana Tais Sibov¹, Fabiana Rossan¹, Paulo Henrique Silveira¹, Walter Humberto Zavala Cárdenas¹, Edson Amaro Junior³, Lionel Fernel Gamarra¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar a marcação intracelular e o processo de quantificação por imagem por ressonância magnética usando nanopartículas magnéticas à base de óxido de ferro recobertas com materiais biocompatíveis em células da linhagem de glioma de rato C6 em experimentos *in vitro*. Esses métodos visam orientar ensaios futuros de indução de tumor *in vivo*, bem como possíveis aplicações da técnica de magneto-hipertermia. **Métodos:** Na avaliação qualitativa da marcação de células C6, realizada mediante microscopia óptica comum, foram utilizadas nanopartículas magnéticas recobertas com aminosilana, dextrana, álcool polivinílico e amido. A influência do agente de transfecção poly-L-lisina na captação celular foi analisada. O processo de quantificação foi realizado mediante a análise de relaxometria em imagens ponderadas em T_1 e T_2 do *phantom*. **Resultados:** A avaliação por microscopia óptica comum mostrou que nanopartículas magnéticas recobertas com aminosilana complexadas e não complexadas com poly-L-lisina apresentam melhor captação pelas células. As relaxatividades de nanopartículas magnéticas recobertas com aminosilana com diâmetro hidrodinâmico de 50nm para um campo de 3T foram: $r_1 = (6,1 \pm 0,3) \times 10^{-5} \text{ms}^{-1} \text{mL}/\mu\text{g}$, $r_2 = (5,3 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ms}^{-1} \text{mL}/\mu\text{g}$; com uma razão de $r_2 / r_1 \cong 9$. O ferro captado pelas células foi calculado pela análise das taxas de relaxação (R_1 e R_2) mediante relação matemática. **Conclusões:** Linhagem de células C6 marcadas com nanopartículas magnéticas revestidas com aminosilana e complexadas com o agente de transfecção poly-L-lisina tem uma alta eficiência de captação das nanopartículas magnéticas. A grande razão $r_2 / r_1 \cong 9$ determina

que essas nanopartículas magnéticas sejam ideais para estudar o processo de quantificação por imagem por ressonância magnética com técnicas de imagem ponderadas em T_2 .

Descritores: Glioma; Linhagem celular tumoral; Nanopartículas; Imagem por ressonância magnética

ABSTRACT

Objective: To assess intracellular labeling and quantification by magnetic resonance imaging using iron oxide magnetic nanoparticles coated with biocompatible materials in rat C6 glioma cells *in vitro*. These methods will provide direction for future trials of tumor induction *in vivo* as well as possible magnetic hyperthermia applications. **Methods:** Aminosilane, dextran, polyvinyl alcohol, and starch-coated magnetic nanoparticles were used in the qualitative assessment of C6 cell labeling via light microscopy. The influence of the transfection agent poly-L-lysine on cellular uptake was examined. The quantification process was performed by relaxometry analysis in T_1 and T_2 -weighted phantom images. **Results:** Light microscopy revealed that the aminosilane-coated magnetic nanoparticles alone or complexed with poly-L-lysine showed higher cellular uptake than did the uncoated magnetic particles. The relaxivities of the aminosilane-coated magnetic nanoparticles with a hydrodynamic diameter of 50nm to a 3-T field were $r_1 = (6.1 \pm 0.3) \times 10^{-5} \text{ms}^{-1} \text{mL}/\mu\text{g}$, $r_2 = (5.3 \pm 0.1) \times 10^{-4} \text{ms}^{-1} \text{mL}/\mu\text{g}$, with a ratio of $r_2 / r_1 \cong 9$. The iron uptake in the cells was calculated by analyzing the relaxation rates (R_1

Estudo realizado no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

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

² Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil; Faculdade de Enfermagem do Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

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

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

Data da submissão: 30/3/2012 – Data de aceite: 25/5/2012

Conflito de interesse: não há.

and R_2) using a mathematical relationship. **Conclusions:** C6 glioma cells have a high uptake efficiency for aminosilane-coated magnetic nanoparticles complexed with the transfection agent poly-L-lysine. The large ratio $r_2/r_1 \cong 9$ indicates that these magnetic nanoparticles are ideal for quantification by magnetic resonance imaging with T_2 -weighted imaging techniques.

Keywords: Glioma; Cell line, tumor; Nanoparticles; Magnetic resonance imaging

INTRODUÇÃO

Diversas abordagens têm sido desenvolvidas, tanto na parte experimental, quanto em aplicações clínicas, sobre o uso de agentes de contraste, utilizados em imagem por ressonância magnética (IRM) para marcação de células. O desenvolvimento de métodos para a detecção *in vivo* de células, bem como a diferenciação de células marcadas com um agente de contraste composto de nanopartículas magnéticas (NPMs) à base de óxido de ferro, fundamentaram a técnica de IRM como uma modalidade crucial no monitoramento de células marcadas com NPMs implantadas. A técnica de IRM se apresenta vantajosa por ser não invasiva e não depositar energia ionizante, sendo ideal para estudos da marcação celular mediante análise dos tempos de relaxação característicos: tempo de relaxação longitudinal (T_1) e tempo de relaxação transversal (T_2).

Nanopartículas de óxido de ferro recobertas com materiais biocompatíveis são desenvolvidos para segmentação do sistema reticuloendotelial (RES)⁽¹⁾, para linfografia por IRM⁽²⁾, para IRM da expressão gênica⁽³⁾, para acompanhar *in vivo* migração celular^(4,6), entre outras aplicações. Essas aplicações dependem fundamentalmente de uma captação eficiente das NPMs pelos diferentes tipos de células. A internalização ou captação das NPMs é realizada mediante o processo de pinocitose, mecanismo em que células internalizam as nanopartículas nas células⁽⁷⁾.

Existem diversas NPMs recobertas com diferentes materiais biocompatíveis, como aminosilana, dextrana, álcool polivinílico (PVA), amido, entre outros, as quais são utilizadas para a marcação celular. A eficiência de captação é baixa em diferentes tipos de células; dessa forma, é necessário realizar a marcação com altas concentrações de NPMs em tempos longos de incubação, porém, há algumas alternativas, como o uso de agentes de transfeção para o aumento da eficiência na captação das NPMs pelas células.

A marcação celular utilizando NPM pode ser realizada por três modos: (i) administração intravenosa de NPM e sua posterior captação pela célula-alvo, (ii) administração direta das NPMs no tecido, e (iii) administração de células marcadas *in vitro* para seu posterior implante no alvo desejado.

Uma das técnicas que utiliza a administração de células marcadas com NPM é a magneto-hipertermia⁽⁸⁾ para estudos *in vivo* no modelo animal (indução do tecido tumoral). A indução do tumor após administração de células marcadas previamente possibilita o monitoramento da evolução do tumor *in vivo* mediante IRM. O tecido tumoral induzido, que está marcado com NPM, pode ser lisado mediante a aplicação da técnica de magneto-hipertermia, a qual tem como base o aumento da temperatura da região do tecido tumoral, a fim de lisar células tumorais, quando estas são submetidas à ação de um campo magnético AC.

Após realizada a marcação das células por métodos descritos anteriormente, é necessário quantificar a carga de ferro por unidade volume do tecido ou por célula, além do monitoramento da célula marcada. Uma das técnicas que permite realizar o monitoramento e a quantificação é a IRM^(9,10).

A compreensão e o controle da marcação celular utilizando NPM se tornam de crucial importância para essas aplicações. A marcação intracelular com NPM se apresenta como um sistema adequado para o monitoramento *in vivo* por IRM (identificação e monitoramento). Essa marcação pode ser realizada *in vivo* ou *in vitro* (por exemplo, células-tronco cultivadas e marcadas antes de sua implantação *in vivo*) por meio de via de internalização celular⁽¹¹⁾.

O presente trabalho teve como propósito otimizar o processo de marcação das células de linhagem de C6 de glioma de rato com diferentes NPMs (magnetita, Fe_3O_4) recobertas com aminosilana, dextrana, PVA e amido. Os quatro tipos de partículas são complexadas com a *poly-L-lysine* (PLL). Após determinar o tipo de NPM (maior captação das NPMs pelas células), foi realizado o processo de quantificação mediante a técnica de IRM, por meio do estudo da relaxometria num tomógrafo de IRM de 3T.

OBJETIVO

Estudo da marcação intracelular e avaliação do processo de quantificação por IRM usando NPMs de óxido de ferro recobertas com materiais biocompatíveis em células de glioma de rato C6, visando a estudos posteriores no processo de indução de tumor *in vivo*, bem como aplicação da técnica de magneto-hipertermia.

MÉTODOS

NPM à base de óxido de ferro

As NPMs utilizadas consistem em partículas superparamagnéticas à base de óxido de ferro recobertas com

aminosilana, dextrana, PVA e amido (Chemicell GmbH, Berlin, Germany). Essas NPMs têm um diâmetro hidrodinâmico de 50nm. A fase cristalina do núcleo superparamagnético corresponde à magnetita (Fe_3O_4). A concentração da suspensão coloidal corresponde a 50mgFe/mL dispersáveis em água bidestilada.

Cultura de células

Cultura de células C6 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) administrado pela Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich (APABCAM). As células foram plaqueadas em uma densidade de 10^7 células por $75cm^2$ em frasco de cultura (Corning, USA) em meio Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, USA), 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, USA) e 1% de L-glutamina (GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, USA). As células foram acondicionadas em cultura a $37^\circ C$, 5% de CO_2 . Uma vez atingida uma confluência das células de 70%, as células C6 aderidas foram coletadas utilizando 0,25% tripsina (GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, USA), a $37^\circ C$, por 5 minutos.

Marcação celular

Para realizar a marcação celular, as células C6 que apresentavam confluência de 70 a 80% foram incubadas *overnight* (~12 horas a $37^\circ C$, 5% CO_2) em 20mL de meio de cultura acrescidos de NPM nas concentrações de 0, 5, 10, 50 e 100 μg Fe/mL. Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e as células C6 foram lavadas duas vezes com SFB para remover as NPMs extracelulares. As células C6 marcadas com NPM foram coletadas com tripsina para remover as células aderidas e manualmente contadas na câmara de Neubauer.

Distribuição intracelular das NPMs nas células C6

A propriedade de internalização de NPM pelas células C6 foi avaliada qualitativamente pela distribuição e localização intracelular das NPM, mediante a coloração de azul da prússia (Prussian Blue Kit, BioPAL Inc., Worcester MA) e análise por microscópio óptico composto (MOC). Esse ensaio citoquímico nas células C6 marcadas foi realizado por um período de 2 minutos.

Essas propriedades foram avaliadas para as concentrações de 10 e 500 μg Fe/mL na presença a na ausência do agente de transfeção PLL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) com concentração de PLL de 1,5 μg /mL.

Avaliação *in vitro* por IRM

Projeto do *phantom*

Foi preparado um *phantom* formado por um conjunto de *ependorf* de 250 μL , preenchidos por *pellets* com igual número de células (5×10^6) incubadas com concentrações de 0, 5, 10, 50 e 100 μg Fe/mL. Os *pellets* nos *ependorfs* foram embebidos com 150 μL de agarose 1% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). Após solidificação do agarose, foi realizada a avaliação por IRM. Para comparação da captação de ferro pelas células C6, um *ependorf*, contendo o agente de contraste numa concentração de 50 μg Fe/mL, foi adicionado ao *phantom*.

Sequência de imagem

A caracterização relaxométrica do *phantom* foi avaliada com um tomógrafo de RM de corpo inteiro de 3T, com uma bobina de punho (Magnetom Vision, Siemens, Germany) e sequências de imagem ponderadas em T_1 e T_2 . Os parâmetros utilizados nas sequências de imagem já foram publicados por Gamarra et al.⁽¹²⁾. Os tempos de relaxação das NPMs foram medidos para as diferentes amostras. Para as medidas dos tempos de relaxação T_2 , foi utilizada a sequência de *multicontrast turbo-spin echo* (se_mc). O tempo de relaxação T_2 de cada amostra de nanopartículas foi calculado ajustando a curva de decaimento com um algoritmo monoexponencial linear $Intensidade = C_1 \exp(-TE/T_2)$. Para as medidas de T_1 , foi utilizada a sequência *multiple spin echo* (SE). A equação da intensidade do sinal para medidas de T_1 é $Intensidade = C_2 (1 - \exp(TR/T_1))$, sendo TE o tempo de eco, TR o tempo de repetição e C_1 e C_2 constantes. As intensidades do sinal de RM de diferentes áreas foram determinadas mediante medidas da região de interesse.

Quantificação das NPMs internalizadas nas células C6 por IRM

A quantificação das NPMs nas células C6 marcadas foi realizada por relaxometria, para o qual foram determinadas as taxas de relaxação ($R_1 = 1/T_1$ e $R_2 = 1/T_2$), em ms^{-1} , para sua posterior correlação com a concentração de NPM nas células e suas relaxatividades r_1 e r_2 (em $ms^{-1}mL/\mu g$). A taxa de relaxação pode ser expressa então por⁽¹³⁾:

$$\frac{1}{T_{1,2}^{Amostra}} = \left(\frac{1}{T_{1,2}^{Suspensão Celular}} \right)_{[Fe]=0} + [Fe] \times r_{1,2}$$

Conhecendo a relaxatividade e o tempo de relaxação da suspensão de células não marcadas ($[Fe]=0$), a concentração de ferro nas diferentes amostras é determinada.

RESULTADOS

Avaliação qualitativa da marcação celular

Para avaliar a marcação das células C6 foram utilizadas NPMs recobertas com aminosilana, dextrana, PVA e amido. As concentrações utilizadas para incubação foram de 10 e 500µg Fe/mL. As células foram incubadas na ausência e na presença do agente de transfecção PLL. A avaliação qualitativa, após teste citoquímico de azul da prússia, pode ser evidenciada na figura 1.

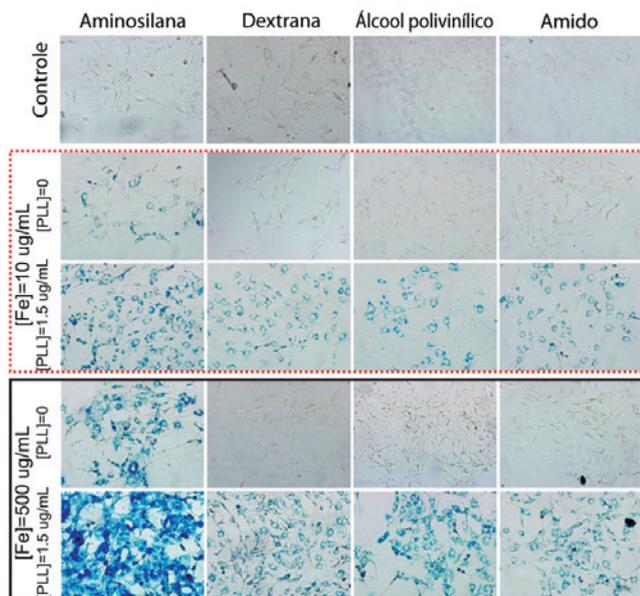


Figura 1. Ensaio citoquímico por azul da prússia evidenciando as células C6 marcadas em diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas, bem como revestidas com aminosilana, dextrana, álcool polivinílico e amido, utilizando agente de transfecção PLL

Determinação da relaxatividade por IRM

As relaxatividades r_1 e r_2 em $ms^{-1} mL/\mu g$ (Tabela 1) foram calculadas mediante análise dos resultados do ajuste linear pelo método dos mínimos quadrados das inclinações dos gráficos de concentração do agente de contraste disperso em água (5 até 100mg Fe/mL) versus

Tabela 1. Parâmetros obtidos da análise das curvas de relaxação variando as concentrações de ferro. O número de células marcadas é o mesmo em cada concentração (5×10^6 células) após o período de incubação

[Fe] (µg/mL)	$r_1 = (6,1 \pm 0,3) \times 10^{-5} ms^{-1} mL/\mu g$		[Fe] captado (µg/mL)	$r_2 = (5,3 \pm 0,1) \times 10^{-4} ms^{-1} mL/\mu g$		[Fe] captado (µg/mL)
	T_1 (ms)	R_1 ($10^5 ms^{-1}$)		T_2 (ms)	R_2 ($10^5 ms^{-1}$)	
0	2.554±21	392±3	-	544±22	184±7	-
5	2.455±17	407±3	0,47±0,04	232±5	431±9	3,2±0,3
10	2.364±19	423±3	0,93±0,10	212±4	472±9	3,7±0,4
50	2.360±23	424±4	0,95±0,12	182±3	550±9	4,7±0,5
100	1.978±3	506±1	3,37±0,28	99±3	1.010±31	10,6±1,2

as taxas de relaxação $R_1 = 1/T_1$ e $R_2 = 1/T_2$. Nesse ajuste, a inclinação corresponde a valores inversos das relaxatividades $1/r_1$ e $1/r_2$ (Figura 2).

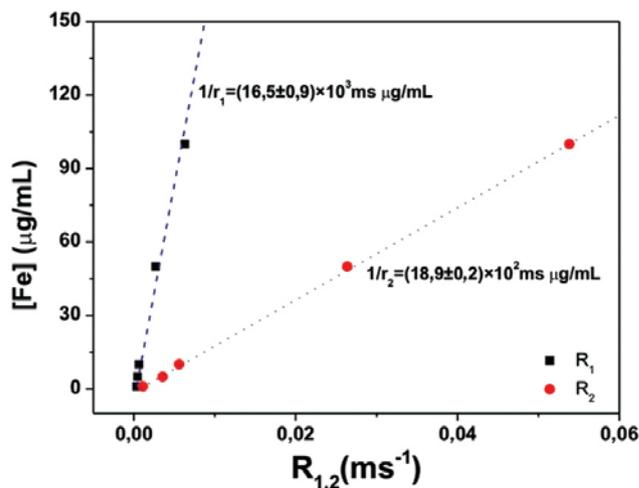


Figura 2. Concentração de Fe versus taxas de relaxação R_1 e R_2 . Os valores de $1/r_1$ e $1/r_2$, resultados do ajuste aos dados experimentais, são mostrados para cada curva ajustada

Quantificação in vitro por IRM

Os tempos de relaxação do próton T_1 e T_2 de células marcadas com NPM para diferentes concentrações foram obtidos mediante análise das imagens por IRM. As curvas das intensidades associadas ao contraste das imagens características de T_1 e T_2 são mostradas na figura 3 e 4. Os valores de T_1 e T_2 , resultados do

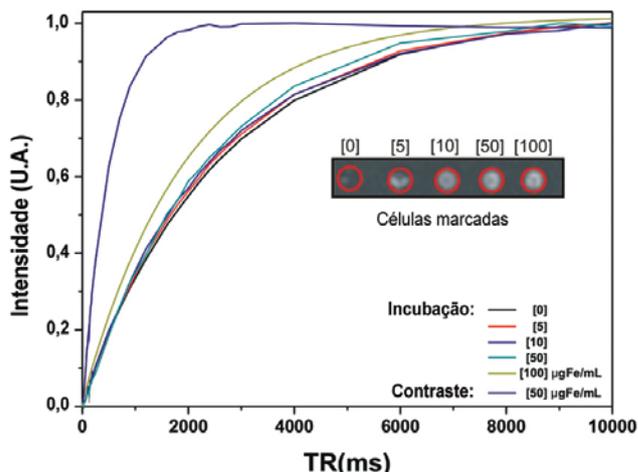


Figura 3. Curvas de intensidade versus TR representativas da relaxação longitudinal obtidas da análise das imagens de ressonância magnética do phantom. Os tempos T_1 de cada curva foram calculados a partir do ajuste aos dados experimentais (valores na tabela 1). No inset é mostrada a imagem de ressonância magnética do phantom ponderada em T_1 obtida mediante a seqüência de multiple SE com TR=500ms e TE=8,5ms. A curva de intensidade do agente de contraste de 50µg Fe/mL é maior que a intensidade de células marcadas comparadas em um mesmo TR

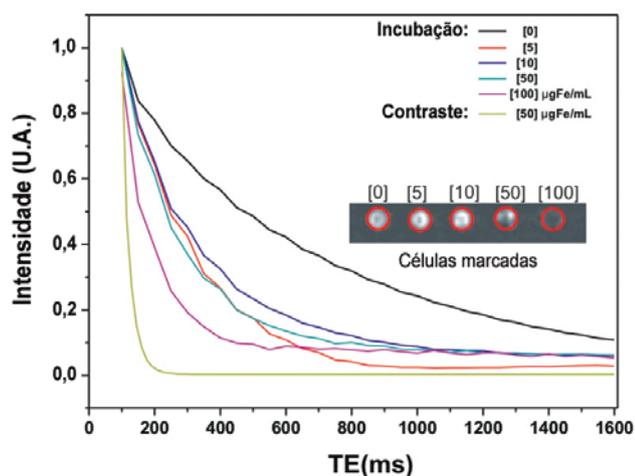


Figura 4. Curvas de intensidade versus TE representativas da relaxação transversal obtidas da análise das imagens de ressonância magnética do *phantom*. Os tempos T_2 de cada curva foram calculados com ajuste aos dados experimentais (valores na tabela 1). No *inset*, é mostrada a imagens de ressonância magnética do *phantom* ponderada em T_2 obtida mediante a sequência se_mc com $TR=3.000ms$ e $TE=26,2ms$. A curva de intensidade do agente de contraste na concentração de $50\mu g Fe/mL$ é menor que a intensidade de células marcadas comparadas em um mesmo TE

ajuste dos dados experimentais às funções características, bem como as taxas de relaxação R_1 e R_2 , são mostrados na tabela 1.

A tabela 1 demonstra o resumo dos parâmetros inerentes da análise das IRM do *phantom* utilizado no presente estudo. São apresentados aí os valores dos tempos de relaxação (T_1 e T_2), as taxas de relaxação (R_1 e R_2), as relaxatividades (r_1 e r_2) e as concentrações de ferro captado pelas células ($[Fe]_{captado}$).

DISCUSSÃO

As imagens obtidas por MOC (Figura 1) evidenciam que NPMs recobertas com dextrana, PVA e amido não são internalizadas pelas células quando incubadas em baixa ($10\mu g Fe/mL$) e alta ($500\mu g Fe/mL$) concentrações. No entanto, quando essas NPMs são complexadas com PLL, as células internalizam NPMs com baixa eficiência de captação. No caso de NPMs revestidas com aminosilana, as células internalizam às NPMs, mesmo sem o uso do PLL. Uma captação maior é evidenciada em comparação com outras NPM. Essa internalização é menor se realizada com as células marcadas com NPMs revestidas com aminosilana e complexadas com PLL, sendo que essa última apresenta uma maior eficiência na marcação das células C6.

O processo de quantificação por IRM da carga do ferro pelas células C6 foi realizado unicamente com NPM revestida com aminosilana e complexada com PLL, devido à sua elevada eficiência na marcação das células C6 em relação aos outras NPMs analisadas.

Da análise de relaxometria por IRM, os valores de r_1 e r_2 calculados da inclinação das curvas da figura 2 foram: $r_1=(6,1\pm 0,3)\times 10^{-5}ms^{-1}mL/\mu g$, $r_2=(5,3\pm 0,1)\times 10^{-4}ms^{-1}mL/\mu g$. Pode-se notar que a relaxatividade r_1 comparado com r_2 é pequena; tal resultado indica que é pequena a distância entre as moléculas de água e os núcleos das NPMs revestidas. Uma relaxatividade ligeiramente maior poderia ser consequência de NPMs agregadas as quais geram uma flutuação de campo magnético local um pouco maior do que NPMs dispersas.

A relaxatividade r_2 é grande. Isso significa que T_2 é muito mais influenciado pelo revestimento das nanopartículas que T_1 , como é de se esperar, dado que aquele é mais sensível a inhomogeneidades magnéticas do que este. Para alcançar o efeito máximo do agente de contraste no T_2 , as NPMs devem ser revestidas com camadas finas quando possível, uma vez que a interação entre partículas magnéticas e moléculas da água depende da distância entre elas.

Em IRM, os tempos de relaxação podem ser manipulados mediante o uso de agente de contraste, por exemplo, T_1 mediante o uso de gadolinium ou manganese e T_2 com óxido de ferro particulado. A eficiência do agente de contraste para IRM é comumente avaliada em termos de sua relaxatividade r_1 e r_2 . Para um agente de contraste T_2 , maior razão r_2/r_1 , é melhor a eficácia do contraste⁽¹⁴⁾. Assim, como o agente de contraste utilizado tem uma razão de $r_2/r_1\approx 9$, NPMs recobertas com aminosilana é um agente de contraste T_2 com alta eficiência num campo de 3T.

No *inset* das figuras 3 e 4 são mostradas imagens ponderadas em T_1 e T_2 , respectivamente. A imagem ponderada em T_1 obtidas nas diferentes concentrações apresentou um incremento da intensidade do sinal pelo incremento da concentração das NPMs captadas pelas células C6 devido ao encurtamento de T_1 , como é evidenciado nas curvas da figura 3. No caso de T_2 ocorre o efeito inverso, como é mostrada na figura 4, pois o incremento na captação de NPMs pelas células C6 equivale à diminuição da intensidade do sinal.

A avaliação por IMR da captação de NPMs pelas células C6 é melhor evidenciada pela análise das imagens ponderadas em T_2 . Tal achado ocorre devido ao recobrimento das NPMs com aminosilana, a qual se apresenta como um agente de contraste de alta eficiência em T_2 . Portanto, para esse agente de contraste, a determinação do ferro captado pelas células deve ser realizada mediante a análise das imagens obtidas ponderadas em T_2 ⁽¹⁵⁾. Já os valores de ferro captados pelas células analisadas em imagens ponderadas em T_1 apontam resultados não confiáveis devido a valores pequenos de R_1 comparados com R_2 , sendo os valores de

captação do ferro mostrados na tabela 1. Após determinação dos parâmetros (T_1 , T_2 , R_1 , R_2 , r_1 e r_2) foram calculadas as concentrações de ferro captadas pelas células C6 ($[Fe]_{\text{captado}}$), conforme exposto na tabela 1. É possível notar que, quando as células são incubadas com uma concentração de $100\mu\text{gFe/mL}$, elas internalizam $10,6\pm 1,2\mu\text{g Fe/mL}$, ou seja, uma porcentagem aproximada de 10% de ferro é internalizado.

CONCLUSÃO

Cultura de linhagem de células C6 marcadas com NPMs revestidas com aminosilana e complexadas com o agente de transfecção PLL apresentaram uma alta eficiência da internalização. As NPMs revestidas com dextrana, PVA e amido, mesmo que complexadas com agente de transfecção PLL, descreveram uma captação deficiente pelas células C6. Os valores da relaxatividade da NPMS revestidas com aminosilana, determinados em um campo magnético de 3T, foram $r_1 = (6,1\pm 0,3)\times 10^{-5}\text{ms}^{-1}\text{mL}/\mu\text{g}$, $r_2 = (5,3\pm 0,1)\times 10^{-4}\text{ms}^{-1}\text{mL}/\mu\text{g}$. A grande razão $r_2/r_1 \cong 9$ determina que essas NPMs são ideais para o estudo do processo de quantificação por IRM com técnicas de imagem ponderadas no tempo de relaxação transversal T_2 .

A padronização do ensaio de marcação de linhagem de células de glioma C6 de rato, bem como o processo de quantificação por IRM em estudos *in vitro* demonstraram ser ferramentas eficientes para os futuros estudos na implementação da técnica da magneto-hipertermia.

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

- Oswald P, Clement O, Chambon C, Schouman-Claeys E, Frija G. Liver positive enhancement after injection of superparamagnetic nanoparticles: respective role of circulating and uptaken particles. *Magn Reson Imaging*. 1997;15(9):1025-31.
- Réty F, Clément O, Siauve N, Cuénod CA, Carnot F, Sich M, et al. MR lymphography using iron oxide nanoparticles in rats: pharmacokinetics in the lymphatic system after intravenous injection. *J Magn Reson Imaging*. 2000; 12(5):734-9.
- Weissleder R, Moore A, Mahmood U, Bhorade R, Benveniste H, Chiozza EA, et al. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med*. 2000;6(3):351-5.
- Lewin J, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*. 2000;18(4):410-4.
- Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, Herynek V, Jordan EK, Duncan ID, et al. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(26):15256-61.
- Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, et al. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19(12):1141-7.
- Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003; 422(6927):37-44.
- 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.
- Liu W, Frank JA. Detection and quantification of magnetically labeled cells by cellular MRI. *Eur J Radiol*. 2009;70(2):258-64.
- Rad AM, Arbab AS, Iskander AS, Jiang Q, Soltanian-Zadeh H. Quantification of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled cells using MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26(2):366-74.
- Modo M, Hoehn M, Bulte JW. Cellular MR imaging. *Mol Imaging*. 2005; 4(3):143-64.
- Gamarra LF, Amaro E Jr, Alves S, Soga D, Pontuschka WM, Mamani JB, et al. Characterization of the biocompatible magnetic colloid on the basis of Fe₃O₄ nanoparticles coated with dextran, used as contrast agent in magnetic resonance imaging. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010;10(7):4145-53.
- Boutry S, Forge D, Burtea C, Mahieu I, Murariu O, Laurent S, et al. How to quantify iron in an aqueous or biological matrix: a technical note. *Contrast Media Mol Imaging*. 2009;4(6):299-304.
- Qin J, Laurent S, Jo YS, Roch A, Mikhaylova M, Bhujwala ZM, et al. A high-performance magnetic resonance imaging T2 contrast agent. *Adv Mater*. 2007;19(14):1874-8.
- Bos C, Delmas Y, Desmoulière A, Solanilla A, Hauger O, Grosset C, et al. In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology*. 2004;233(3):781-9.