

Monitoramento por imagem de ressonância magnética do crescimento tumoral no modelo C6 de glioblastoma com perspectivas de avaliação da terapia de magnetohipertemia

Tumor growth analysis by magnetic resonance image of the C6 glioblastoma model with prospects for the assessment of magnetohyperthermia therapy

André César da Silva¹, Francisco Romero Cabral¹, Javier Bustamante Mamani¹, Jackeline Moraes Malheiros², Roberson Saraiva Polli², Alberto Tannus², Edson Vidoto², Mateus José Martins², Tatiana Tais Sibov¹, Lorena Favaro Pavon¹, Liza Aya Mabuchi Miyaki¹, Walter Humberto Zavala Cárdenas¹, Suzana Maria Fleury Malheiros³, Reynaldo André Brandt⁴, Edson Amaro Junior¹, Lionel Fernel Gamarra¹

RESUMO

Objetivo: Estabelecer um padrão de crescimento tumoral (volume) em ratos Wistar submetidos ao modelo C6 de glioblastoma multiforme por meio de imagens de ressonância magnética para posterior verificação de redução de volume tumoral com a terapia de magnetohipertemia. **Métodos:** Para o modelo C6, utilizamos ratos Wistar, machos, jovens, pesando entre 250 e 300 g. Após anestesiados (cetamina 55 mg/kg e xilazina 11 mg/kg) foram injetadas estereotaxicamente células tumorigênicas linhagem C6 suspensas em meio de cultura (10^5 células em $10 \mu\text{L}$) no córtex frontal direito (coordenadas a partir do bregma: anteroposterior = 2,0 mm; látero-lateral = 3,0 mm; profundidade = 2,5 mm) com uma seringa Hamilton. No Grupo Controle, houve a injeção do meio de cultura sem as células. Posteriormente, foram feitas imagens mediante a técnica de imagem por ressonância magnética em 14, 21 e 28 dias após a injeção em um escâner de imagem por ressonância magnética 2.0 T (Bruker BioSpec, Germany). Para o exame, os animais foram anestesiados com cetamina 55 mg/kg e xilazina 11 mg/kg. Multifatias coronais foram adquiridas utilizando uma sequência *spin-echo* padrão com os seguintes parâmetros: TR/TE = 4,000 ms/67,1 ms, FOV = 3,50, Matrix 192, *slice thickness* = 0,4 mm e *slice separation* = 0 mm. **Resultados:** A análise das imagens de ressonância magnética do tumor possibilitou a clara visualização da massa tumoral, sendo possível ainda estabelecer parâmetros de volume tumoral nos diferentes dias analisados. O volume de 14 dias após a indução do foi

de $13,7 \pm 2,5 \text{ mm}^3$. Aos 21 dias, o volume alcançado foi de $31,7 \pm 6,5 \text{ mm}^3$ e, aos 28 dias, a massa tumoral atingiu $122,1 \pm 11,8 \text{ mm}^3$.

Conclusão: Estes resultados mostraram a possibilidade de avaliação do volume tumoral no modelo C6 em ratos, o que possibilitará, no futuro, a aplicação da terapia de magnetohipertemia bem como verificação de seus resultados.

Descritores: Imagem por ressonância magnética; Glioblastoma/terapia; Neoplasias encefálicas; Ratos Wistar

ABSTRACT

Objective: The objective was to establish a pattern of tumor growth of the C6 model of glioblastoma multiform in Wistar rats via magnetic resonance imaging (MRI) for the subsequent verification of tumor volume reduction due to magnetic hyperthermia therapy. **Methods:** Young male Wistar rats weighing between 250 and 300 g were used for the C6 model. After the rates were anesthetized (55 mg/kg ketamine and 11 mg/kg xylazine), C6 lineage tumorigenic cells suspended in culture medium (10^5 cells in $10 \mu\text{l}$) were stereotaxically injected into the right frontal cortex (bregma coordinates: 2.0 mm anteroposterior, 3.0 mm laterolateral, and 2.5 mm depth) of the rats using a Hamilton syringe. For the control group, the rats were injected with culture medium without cells. MRI scans were performed at 14, 21, and 28 d after the injection using a 2.0 T MRI scanner (Bruker

Estudo realizado no Instituto do Cérebro, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

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

²Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, São Carlos (SP), Brasil.

³Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil; Departamento de Oncologia, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

⁴Centro de Neuro-Oncologia, Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein – SBIBAE, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Lionel Fernel Gamarra – Instituto Israelita de Pesquisa – Avenida Albert Einstein 627/701 – Morumbi – CEP: 05651-901 – São Paulo (SP), Brasil – E-mail: lgamarra@einstein.br

Fontes de auxílio à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Data de submissão: 13/1/2011 – Data de aceite: 24/2/2012

Conflito de interesse: Não há

BioSpec, Germany). The animals were anesthetized with 55 mg/kg ketamine and 11 mg/kg xylazine before being examined. Coronal multilayers were acquired using a standard spin echo sequence with the following parameters: repetition/echo time = 4.000 ms/67.1 ms, field of view = 3.50, matrix = 192, slice thickness = 0.4 mm, and slice separation = 0 mm. **Results:** The MRI analysis enabled a clear visualization of the tumor mass, and it was possible to establish the tumor volume parameters on the various days that were examined. The volume at 14 d after induction was $13.7 \pm 2.5 \text{ mm}^3$. On days 21 and 28, the tumor volumes were $31.7 \pm 6.5 \text{ mm}^3$ and $122.1 \pm 11.8 \text{ mm}^3$, respectively. **Conclusion:** These results demonstrated that it is possible to evaluate the C6 model tumor volume in rats, which will allow for the future implementation and verification of magnetic hyperthermia therapy.

Keywords: Magnetic resonance imaging; Glioblastoma/therapy; Brain neoplasms; Rats, Wistar

INTRODUÇÃO

Gliomas são tumores neuroepiteliais que se originam das células da glia, correspondentes a 31% dos tumores primários e a 80% dos tumores malignos do sistema nervoso central (SNC). Os astrocitomas correspondem a 76% de todos os gliomas, e o glioblastoma representa 53,7% dos casos⁽¹⁾. O glioblastoma multiforme (GBM) é o mais frequente e maligno dos astrocitomas e, apesar de inúmeros avanços no diagnóstico e tratamento desses tumores, seu prognóstico permanece ainda bastante limitado, pois pacientes apresentam sobrevida inferior a 1 ano^(2,3). Desse modo, é de extrema relevância a procura de novas abordagens terapêuticas, que promovam uma melhor qualidade de vida ao portador de câncer cerebral.

Nesse sentido, diversas terapias têm sido propostas para os gliomas, como estratégias químio e/ou radioterápicas⁽⁴⁾. Nas últimas décadas, associadas a essas terapias, tem-se utilizado a termoterapia, que consiste no aumento da temperatura tumoral (43 a 47°C), com o intuito de destruir as células tumorais⁽⁵⁻⁹⁾. Estudos recentes têm demonstrado que a hipertermia pode ser induzida de maneira localizada por meio da aplicação de nanopartículas magnéticas que aquecem a região tumoral frente à aplicação de um campo magnético alternado. Essa terapia, chamada magnetohipertermia (MHT), tem demonstrado bons resultados em estudos pré-clínicos⁽¹⁰⁾ ou mesmo clínicos⁽¹¹⁾.

No entanto, a busca de novas terapias requer o uso de modelos animais capazes de mimetizar o que acontece em humanos. Atualmente, diversos modelos animais têm sido propostos, sendo que a maior parte deles utiliza ratos e camundongos^(12,13) como animais de experimentação.

Nas últimas décadas, um modelo em ratos da linhagem Wistar, denominado C6, tem sido amplamente uti-

lizado, mostrando boa aplicabilidade⁽¹⁴⁻¹⁹⁾. Esse modelo foi desenvolvido por Benda et al.⁽²⁰⁾, que verificou que, após múltiplas injeções de N-methylnitrosourea (MNU) durante aproximadamente 8 meses eram capazes de desenvolver tumor cerebral em ratos Wistar. As células tumorigênicas foram cultivadas e, a partir do sexto clone (C6), desenvolveu-se a linhagem. Esses tumores tinham origem glial e apresentavam características semelhantes ao desenvolvimento de GBM, apresentando crescimento e invasão encontrados em tumores humanos⁽²¹⁾. Apesar de ser um modelo vastamente utilizado, observou-se uma grande variabilidade na literatura, em relação à progressão tumoral, não encontrando um padrão de crescimento. Para a implementação da MHT, bem como outras terapias, é de suma importância obter estes parâmetros na progressão do tumor.

OBJETIVOS

Estabelecer o padrão de crescimento tumoral (volume) de ratos Wistar, submetidos ao modelo C6 de GBM, por meio de imagens de ressonância magnética (IRM), para verificar, futuramente, a redução do volume tumoral, com a terapia de MHT.

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 reduzido ao máximo o número de animais utilizados, bem como o sofrimento e o estresse deles.

Para o modelo C6, foram utilizados ratos Wistar, machos, com 2 meses de idade, pesando entre 250 e 300 g. Os animais foram mantidos no Biotério do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia (CETEC) do Instituto do Cérebro (InCe) 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), obedecendo a um ciclo claro-escuro de 12 horas (7 a 19h), com temperatura ambiente constante de $21 (\pm 2^\circ\text{C})$, conforme especificações internacionais.

Para a realização da IRM, 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, onde foram mantidas 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°C (5% CO₂), no qual alcançaram 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 800 rpm por 5 minutos, ressuspensas em meio Dulbecco's, a uma concentração final de 10⁵ células/10 µL e mantidas resfriadas até sua implantação.

Implante estereotáxico das células C6

Para o implante das células C6, os animais foram anestesiados com cetamina (55 mg/kg) e xilazina (11 mg/kg). Em seguida foi feita a tricotomia da região superior da cabeça. O animal foi fixado a um aparelho estereotáxico (Stoelting®, modelo 51700) por meio de barras intra-auriculares e dentes incisivos superiores. Após a incisão da pele na região dorsal do crânio e a remoção do periosteio, 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 (1992) e seguiu as coordenadas: anteroposterior = 2,0; látero-lateral = 2,0; profundidade = 2,5. O implante das células tumorigênicas de glioma no córtex frontal direito foi feito com a agulha de uma seringa Hamilton, na concentração de 10⁵ células em 10 µL de meio de cultura, que foi injetado lentamente por um período de 10 minutos. Nos animais do Grupo Controle, foi injetado o meio de cultura sem células. 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.

Análise tumoral por RM

Antes da realização de cada sessão de imagens, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (95 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg). Após tal procedimento, eles foram posicionados em decúbito ventral sobre um leito macio e absorvente, sendo que, após o posicionamento da cabeça dentro da bobina, esta foi fixada às

barras auricular e nasal, e, então, todo o conjunto foi introduzido na blindagem. Por último, todo esse conjunto foi introduzido no magneto, que tem diâmetro interno de 150 mm.

As IRM foram adquiridas utilizando um magneto supercondutor horizontal com campo 2T da *Oxford Instruments* (modelo 65310HR), que opera em conjunto com um espectrômetro Bruker®. A sequência utilizada para a aquisição das imagens ponderadas por T₂ foi a RARE (do inglês *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*), com parâmetros: TR = 4,000 ms, TE = 67,1 ms, rare factor = 6, 18 médias e comprimento de banda de 12,5 KHz, resultando em um tempo de aquisição de cerca de 50 minutos por animal. O FOV utilizado foi de 35 x 35 mm³, com uma matriz de 192 x 192 pontos, produzindo uma resolução espacial de 182 x 182 µm. Foram utilizadas 26 fatias de 0,5 mm de espessura sem espaçamentos entre elas.

Para cada sessão de imagens em cada ponto temporal, dos 26 cortes adquiridos, foram selecionados os cortes em que era possível visualizar o tumor e dessa forma desenhadas ROIs (*Region of Interest*) com a ajuda do *software Paravision 5*®. Foi obtida, então, a área tumoral em cada corte, que, somada e multiplicada pela espessura da fatia, forneceu o volume do tumor.

Análise histopatológica do tecido tumoral

Após a aquisição das imagens, os animais 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; em seguida, foram crioprotetidos em uma solução de sacarose 40%, por 48 horas. Posteriormente, foram feitas em criostato (leica) fatias coronais de 40 µm, que foram coradas com a técnica padrão de hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

Análise do volume tumoral por RM

A evolução do crescimento tumoral do modelo C6 foi monitorada mediante a técnica de IRM (Figura 1). Como controle da evolução temporal do tumor, foi injetado somente meio de cultura e não se observou a presença do tecido tumoral durante um período de 28 dias, como é mostrado na figura 1A.

No 14º, dia foi observada uma massa tumoral (tumor + edema + área necrótica) que possuía um formato circular bem definido em relação ao tecido cerebral adjacente e, dessa forma, foi possível delimitá-lo devido ao sinal intenso na região afetada. O volume calcula-

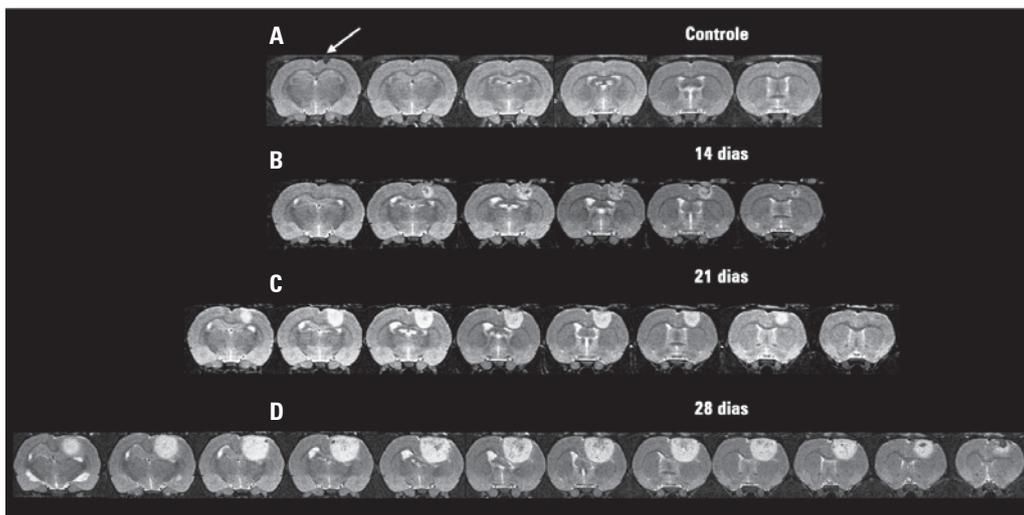


Figura 1. Evolução tumoral do modelo C6 acompanhada por imagem de ressonância magnética. Estas imagens apresentam seqüências de fatias dos cérebros, nas quais foi possível observar o tumor. (A) Cérebros em que foi injetado somente o meio de cultura e não se observou crescimento tumoral. Note (seta), superficialmente ao córtex, a região de introdução da agulha. (B) Após 14 dias, foi possível observar sinal intenso na região de inoculação das células tumorigênicas, na qual o volume do tumor alcançou $13,7 \pm 2,5 \text{ mm}^3$. (C) No 21º dia, pode-se evidenciar um tumor circular bem delimitado com volume de $31,7 \pm 6,5 \text{ mm}^3$. (D) 28 dias após a inoculação, foi possível observar uma grande massa tumoral promovendo compressão da região ventricular, cujo volume calculado foi de $122,1 \pm 11,8 \text{ mm}^3$

do nesse dia foi de $13,7 \pm 2,5 \text{ mm}^3$ (Figura 1B). No 21º dia, pudemos observar o tumor claramente delimitado, que promovia a compressão da região ventricular direita com o volume de $31,7 \pm 6,5 \text{ mm}^3$ (Figura 1C). No 28º dia, o crescimento tumoral prosseguiu alcançando o volume de $122,1 \pm 11,8 \text{ mm}^3$ (Figura 1D). Após isso, os animais foram sacrificados e seus cérebros, retirados para análise posterior.

Análise histopatológica

A avaliação histopatológica do glioma implantado em rato Wistar está apresentada na figura 2. Os achados foram compatíveis com os previamente demonstrados por Morrone et al.⁽²²⁾ onde o tumor apresentou características de GBM. Na figura 2 mostra a seção histológica (Figura 2A) e IRM (Figura 2B) do tumor de glioblastoma. Dentro as características do GBM, destacamos áreas necróticas, presença de células atípicas do tipo pseudopaliçadas (Figura 2C), células gigantes (Figura 2D) além de áreas hemorrágicas.

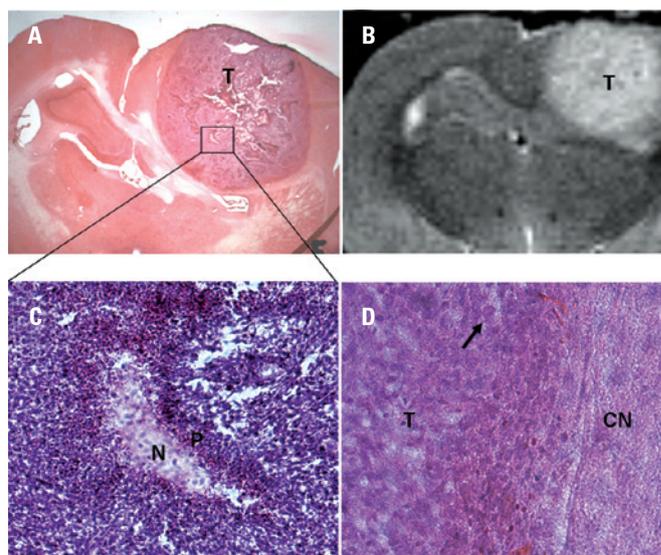


Figura 2. Características histopatológicas do modelo C6. (A) Seção histológica e (B) imagem de ressonância magnética mostrando o tumor circular claramente delimitado "T" comprimindo estruturas ventriculares. (C) N, área de necrose, e P, células pseudopaliçadas adjacentes à região de necrose. (D) Borda do tumor com presença de células gigantes (seta) e CN, tecido cerebral normal. Aumento: (A) x10, (B) x10, (C) x100, (D) x400

DISCUSSÃO

GBM é um tumor primário do SNC altamente agressivo, cuja média de sobrevivência não ultrapassa 15 meses após o diagnóstico, apesar de todas as terapias disponíveis^(4,23). Assim, tentativas de novas terapias são de extrema importância. A MHT surge como terapia aditiva às existentes, com bons resultados⁽¹¹⁾. Estudos desde a década de 1990 vêm sendo conduzidos, mostrando que o uso de nanopartículas magnéticas são extremamen-

te eficientes na geração de calor após aplicação de um campo magnético, sendo este capaz de destruir células cancerígenas oriundas do sistema nervoso⁽²⁴⁾. Além disso, trabalhos recentes de Van Landeghem et al.⁽²⁵⁾ mostraram em humanos a capacidade da MHT melhorar a sobrevida dos pacientes portadores de GBM.

O modelo C6 apresenta características histopatológicas, como células pseudopaliçadas, áreas de necrose, proliferação microvascular, entre outras compatíveis

ao encontrado em pacientes com GBM⁽²⁶⁾. Aqui foram confirmadas essas características, o que torna tal modelo uma ferramenta útil no desenvolvimento de novas terapias como, por exemplo, a MHT. Entretanto, para a avaliação da MHT, é de grande importância um acompanhamento do desenvolvimento tumoral, visto que a terapia visa à redução no volume do tumor. IRM permitem que seja realizado um acompanhamento do volume tumoral, assim como de modificações e deformações das regiões circunvizinhas⁽²⁷⁾. Neste trabalho, foi possível, por meio de IRM, avaliar o rápido crescimento da massa tumoral, que evolui comprimindo a região ventricular ao longo do eixo rostro-caudal. O volume do tumor em ratos, mensurado 20 dias após o implante das células cancerígenas e analisado por meio de imagens *in vivo* por IRM, mostrou-se similar ao volume encontrado em estudos histológicos de Morrone et al.⁽²²⁾. Isso demonstra que a mensuração do tumor por imagem pode fornecer dados fiéis da magnitude do tumor *in vivo* e do comprometimento de outras estruturas cerebrais que podem estar sendo comprimidas, além de permitir a correlação de dados comportamentais e histológicos no mesmo animal.

CONCLUSÃO

A análise das IRM possibilitou a clara visualização da massa tumoral e seu crescimento, possibilitando ainda estabelecer parâmetros de volume tumoral nos diferentes dias analisados no modelo C6. Os resultados obtidos são muito importantes para a aplicação da técnica de MHT, dado que a evolução do crescimento do tumor está diretamente relacionado à potência do campo magnético e o tempo que a terapia deve ser aplicada ao volume tumoral.

REFERÊNCIAS

- Central Brain Tumor Registry of the United States. CBTRUS statistical report. Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2004-2006 [Internet]. Hinsdale (IL): CBTRUS; 2010 Feb [cited 2012 Feb 23]. Available from: <http://www.cbtrus.org/2010-NPCR-SEER/CBTRUS-WEBREPORT-Final-3-2-10.pdf>
- Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(2):139-52.
- Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359(5):492-507.
- Shirai K, Chakravarti A. Towards personalized therapy for patients with glioblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11(12):1935-44.
- Overgaard J. The current and potential role of hyperthermia in radiotherapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*. 1989;16(3):535-49.
- Herman TS, Teicher BA, Jochelson M, Clark J, Svensson G, Coleman CN. Rationale for use of local hyperthermia with radiation therapy and selected anticancer drugs in locally advanced human malignancies. *Int J Hyperthermia*. 1988;4(2):143-58.
- Anderson RL, Kapp DS. Hyperthermia in cancer therapy: current status. *Med J Aust*. 1990;152(6):310-5.
- Sneed PK, Stauffer PR, McDermott MW, Diederich CJ, Lamborn KR, Prados MD, et al. Survival benefit of hyperthermia in a prospective randomized trial of brachytherapy boost +/- hyperthermia for glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998;40(2):287-95.
- Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*. 2002;3(8):487-97.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fomchenko EI, Holland EC. Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin Cancer Res*. 2006;12(18):5288-97.
- Day SE, Kettunen MI, Cherukuri MK, Mitchell JB, Lizak MJ, Morris HD, et al. Detecting response of rat C6 glioma tumors to radiotherapy using hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate and ¹³C magnetic resonance spectroscopic imaging. *Magn Reson Med*. 2011;65(2):557-63.
- Ulmer S, Reeh M, Krause J, Herdegen T, Heldt-Feindt J, Jansen O, et al. Dynamic contrast-enhanced susceptibility-weighted perfusion MRI (DSC-MRI) in a glioma model of the rat brain using a conventional receive-only surface coil with an inner diameter of 47 mm at a clinical 1.5 T scanner. *J Neurosci Methods*. 2008;172(2):168-72.
- Doblas S, He T, Saunders D, Pearson J, Hoyle J, Smith N, et al. Glioma morphology and tumor-induced vascular alterations revealed in seven rodent glioma models by *in vivo* magnetic resonance imaging and angiography. *J Magn Reson Imaging*. 2010;32(2):267-75.
- Doblas S, He T, Saunders D, Hoyle J, Smith N, Pye Q, et al. *In vivo* characterization of several rodent glioma models by (1) H MRS. *NMR Biomed* [DOI: 10.1002/nbm.1785]. 2011 [cited 2011 Sep 23]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/nbm.1785/full>
- Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, Roussel S, Segebarth C, Petit E, et al. *In vivo* MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage*. 2008;40(2):973-83.
- Pannetier N, Lemasson B, Christen T, Tachrount M, Troprès I, Farion R, et al. Vessel size index measurements in a rat model of glioma: comparison of the dynamic (Gd) and steady-state (iron-oxide) susceptibility contrast MRI approaches. *NMR Biomed*. 2012;25(2):218-26.
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*. 1968;161(3839):370-1.
- Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res*. 2002;310(3):257-70.
- Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, et al. *In vivo* glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer*. 2006; 23;6:226.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
- 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.
- van Landeghem FK, Maier-Hauff K, Jordan A, Hoffmann KT, Gneveckow U, Scholz R, et al. Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles. *Biomaterials*. 2009;30(1):52-7.
- Braganhol E, Huppkes D, Bernardi A, Wink MR, Lenz G, Battastini AM. A comparative study of ectonucleotidase and P2 receptor mRNA profiles in C6 cell line cultures and C6 *ex vivo* glioma model. *Cell Tissue Res*. 2009;335(2):331-40.
- Puax AL, Ong LC, Jin Y, Teh I, Hong M, Chow PK, et al. A comparison of imaging techniques to monitor tumor growth and cancer progression in living animals. *Int J Mol Imaging*. 2011;2011:321538.