

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Nanopartículas superparamagnéticas de
óxido de ferro (SPION): potencialidade da
sua aplicação como transportador de
genes e agente de contraste**

Carolina Farate e Laia

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2020

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



**Nanopartículas superparamagnéticas de
óxido de ferro (SPION): potencialidade da
sua aplicação como transportador de
genes e agente de contraste**

Carolina Farate e Laia

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Prof. Ing. DrSc. René Kizek
Co-Orientador: Investigadora auxiliar Maria Luísa Teixeira de
Azevedo Rodrigues Corvo**

2020

This laboratory work was developed under the Erasmus+ Programme at:

Prevention Medicals Laboratory

with collaboration of University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences

Brno, Czech Republic



Resumo

O conhecimento e o interesse pelo uso de partículas magnéticas que podem ser manipuladas por campos magnéticos têm crescido exponencialmente. Estas partículas são geralmente constituídas por dois componentes, um material magnético, frequentemente ferro, níquel ou cobalto, e um invólucro protetor que facilita a ligação com fármacos, adjuvantes e ligandos direcionadores. No caso particular das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION-sigla em inglês), estas destacam-se pelo seu papel importante nos desenvolvimentos da nanomedicina, devido à sua biocompatibilidade, baixo custo de produção, superparamagnetismo, tamanho e possibilidade de ser feito um revestimento biocompatível. As suas aplicações diagnósticas e mesmo terapêuticas, tornam estas nanopartículas (NPs) promissoras em vários campos da medicina. As diversas possibilidades de formulações baseadas em SPION possibilitam as suas aplicações farmacêuticas para separação e deteção de células, reparação de tecidos, hipertermia magnética, administração de fármacos, entre outros.

Apesar das vantagens que os usos das SPION nos possam trazer, há ainda uma grande necessidade de abordar questões como a biocompatibilidade e segurança associadas ao uso destas NPs, os vários efeitos colaterais típicos de terapias que as envolvam e ainda as estratégias existentes para superar estes problemas. As SPION são vistas como materiais promissores no campo de deteção, rastreamento e tratamento de diversas doenças, como o cancro. A possibilidade de modificar a sua superfície e as características do seu núcleo fazem das SPION um agente de contraste específico para ressonância magnética (RM), mas também uma família intrigante de marcadores para medicina nuclear.

Este trabalho pretende apresentar uma perspetiva sobre o estado da arte e os avanços das SPION para aplicações farmacêuticas, dando especial ênfase ao seu uso como transportadores para a entrega de genes e como agentes de contraste para RM. Desta forma, potencia-se o uso das mesmas, através da entrega de ácidos nucleicos para tratamento de doenças e do acompanhamento, de forma não invasiva, do efeito da terapia genética.

Palavras-chave: SPION, transportador de genes, agentes de contraste, ácidos nucleicos, ressonância magnética.

Abstract

The knowledge and interest in the use of magnetic particles, which can be manipulated by magnetic fields, have grown exponentially. These particles generally consist of two components, a magnetic material, often iron, nickel or cobalt, and a protective casing that facilitates the connection with drugs, adjuvants and targeting ligands. In the particular case of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), they stand out for their important role in nanomedicine developments, due to their biocompatibility, low cost of production, superparamagnetism, size and the possibility of being done a biocompatible coating. Their diagnostic and teragnostic applications make these nanoparticles (NPs) promising in several fields of medicine. The various possibilities of SPION-based formulations enable its pharmaceutical applications for cell separation and detection, tissue repair, magnetic hyperthermia, medication administration, among others.

Despite the advantages that the uses of SPION can bring us, there is still a great need to address the issues of biocompatibility and safety associated with the use of these NPs, the various effects associated with the therapies they involve and the strategies to overcome this problems. SPION are promising materials in the field of detection, screening and treatment of several diseases, such as cancer. The possibility of modifying the surface and the characteristics of its core make SPIONs a specific contrast agent for magnetic resonance imaging (MRI), but also an intriguing family of markers for nuclear medicine.

This work intends to present a perspective on the state of the art and the advances of SPIONs for pharmaceutical applications, with special emphasis on its use as carriers for the delivery of genes and as a contrast agents for magnetic resonance imaging. As a result, their use is enhanced, through the delivery of nucleic acids for the treatment of diseases and the non-invasive monitoring of the effect of gene therapy.

Key words: SPION, gene carrier, contrast agent, nucleic acids, magnetic resonance imaging.

Abreviaturas

CEA	Antígeno carcinoembrionário
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMA	Campo magnético alternado
CMC	Concentração micelar crítica
CME	Campo magnético externo
CPT-11	Cloridrato de irinotecano
CS	Quitossano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
dsDNA	DNA de cadeia dupla
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aprimorada
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GBCAS	Agentes de contraste à base de gadolínio
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>
HGF	Hepatócitos
IOMNP	<i>Iron oxide magnetic nanoparticle</i>
IONP	<i>Iron oxide nanoparticle</i>
IR	Insuficiência renal
LP	Lipossoma
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
MPS	Sistema mononuclear fagocitário
NP	Nanopartícula
NPM	Nanopartícula magnética
NSF	Fibrose sistêmica nefrogénica
PAA	Ácido poliacrílico
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polietilenoimina
PLGA	Poli (D, L-lactido-co-glicolídeo)
PLR	Poli-L-arginina
PPARs	Recetores ativados por proliferadores de peroxissoma
PVA	Poli (acetato de vinila)

qPCR	PCR em tempo real
RISC	<i>RNA-induced silencing complexes</i>
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Reactive oxygen species
scFv	Fragmentos de anticorpos de cadeia única
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	RNA de pequena interferência
SN-38	7-etil-10-hidroxicamptotecina
SPION	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i>
ssDNA	DNA de cadeia simples
TFD	Terapia fotodinâmica
Tie1	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>
USPIO	<i>Ultrasmall superparamagnetic iron oxide</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Índice

1. Introdução	9
2. Objetivo	9
3. Métodos.....	10
4. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro	11
4.1 Caraterísticas.....	11
4.2 Síntese de SPION	13
4.3 Toxicidade.....	16
5. Formulações baseadas em SPION	18
6. Aplicações clínicas	22
6.1 SPION como transportador de genes	25
6.2 SPION como agente de contraste	32
6.3 SPION como agentes de teragnóstica	35
7. Conclusão	38
8. Referências Bibliográficas	40

Índice de figuras

Figura 1: Representação esquemática de uma SPION com multicamadas, constituída por um núcleo, revestimento e porções para direcionamento, como pequenos ligandos, anticorpos monoclonais e aptâmeros, permitindo o reconhecimento pelos recetores correspondentes. Adaptado de (7)	12
Figura 2: Representação esquemática da entrega de biofármacos acionada magneticamente. A. Acumulação/retenção local de SPION nos locais-alvo (tecidos e células) sob a influência de um íman externo. B. Sedimentação rápida e entrega intracelular eficaz de SPION. C. Penetração de SPION em vários modelos de 3D, como hidrogéis e agregados celulares. Adaptado de (14).....	27
Figura 3: Complexos micelares multifuncionais de siRNA-PEG carregados com SN-38/USPIO. Adaptado de (55).....	36

1. Introdução

O conhecimento e o interesse pelo uso de partículas magnéticas têm crescido exponencialmente, especialmente no caso das SPION, e a sua disponibilidade decorre dos avanços que tem existido na área da nanotecnologia. As propriedades únicas destas NPs como baixa toxicidade, biocompatibilidade, comportamento superparamagnético, fácil síntese e a possibilidade de modificação da sua superfície, permitem que estas possam integrar muitos campos da medicina (1). Neste sentido, a sua aplicação tem sido explorada para administração direcionada de fármacos no tratamento de cancro e outras doenças, assim como, a sua utilidade médica nas técnicas de imagem para visualização de tumores e alterações estruturais do tecido, permitindo o diagnóstico precoce (2). Com uma caracterização mais detalhada das características morfológicas, magnéticas e propriedades de relaxamentos das SPION, como se relacionam com moléculas terapêuticas, como fármacos, microRNA (miRNA) ou RNA de pequena interferência (siRNA), poderemos usá-las para diagnóstico e terapêutica de forma segura para aumentar a esperança de vida e prolongar a sobrevivência dos doentes.

Esta revisão da literatura pretende fornecer uma perspetiva sobre o estado da arte e os avanços das SPION para aplicações farmacêuticas, nomeadamente, sobre o seu uso como agentes de contraste para RM e como *gene carriers* (transportador de genes).

2. Objetivo

O objetivo primário pretendido era a realização de uma tese prática de trabalho de campo inserida no Programa Erasmus, onde seria investigada a interação entre as SPION e os ácidos nucleicos. Devido à pandemia e à impossibilidade da realização da investigação em Brno, República Checa, este trabalho transformou-se numa tese teórica que pretende apresentar uma visão geral do conhecimento atual e desenvolvimentos recentes referentes às SPION, bem como expor as potenciais abordagens terapêuticas que resultam da sua manipulação, nomeadamente, como agentes de diagnóstico e terapêutica (teragnóstica).

3. Métodos

A pesquisa para a realização da revisão da literatura foi baseada em recursos eletrônicos, recorrendo à base de dados Pubmed e ao alojamento ReserchGate. A pesquisa teve início a 20 de fevereiro de 2020, onde o objetivo inicial ainda era a elaboração de um trabalho prático. A 18 de março de 2020, a pesquisa começou a ser direcionada mais especificamente para revisão da literatura, tendo terminado a 1 de junho de 2020. Pontualmente foram realizadas pesquisas fora destas datas. A partir da análise dos artigos da pesquisa inicial de literatura, foram identificados mais alguns artigos relevantes. Por forma a evitar conteúdo datado e dando maior relevância aos avanços recentes, a pesquisa foi feita com base em artigos essencialmente publicados entre 2015 e 2020. No entanto, a pesquisa foi alargada a anos anteriores para referenciar artigos importantes na área. As palavras-chave utilizadas foram as seguintes: SPION, transportador de genes, agentes de contraste, ácidos nucleicos, ressonância magnética.

Foram assim analisados 103 artigos e documentos que não publicações, dando especial relevância aos documentos que abrangessem os seguintes temas relacionados com as SPION: características, toxicidade e síntese, formulações baseadas em SPION e as suas aplicações clínicas, terapia genética e agentes de contraste. Deste modo, no final do trabalho, foram incluídas 57 referências bibliográficas.

4. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro

As nanopartículas magnéticas (NPMs) são uma classe de NPs que podem ser manipuladas através de campos magnéticos. Estas partículas são geralmente constituídas por dois componentes, um material magnético, frequentemente ferro, níquel ou cobalto, e um invólucro protetor que facilita a ligação com fármacos, adjuvantes e ligandos direcionadores (3). Especificamente, as SPION, partículas cujo principal componente é o ferro, têm um papel importante nos desenvolvimentos da nanomedicina, devido à sua biocompatibilidade, baixo custo de produção, comportamento superparamagnético, fácil síntese e a possibilidade de modificação da superfície, tornando-as quase universalmente presentes como principais componentes em agentes de contraste para RM, fontes de hipertermia magnética ou vetores para a administração de fármacos (4). Em geral, as SPION são partículas formadas por pequenos cristais de óxido de ferro (chamados magnetite, Fe_3O_4 ou maghemite, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que podem ser modificadas à superfície para obter estabilidade coloidal em meios aquosos. Estas modificações podem envolver a ligação de SPION a ácidos orgânicos (por exemplo, ácido cítrico) ou o revestimento com um polímero hidrofílico biocompatível (por exemplo, poli(etileno glicol) ou polissacáridos) (5).

4.1 Caraterísticas

As SPION para aplicação farmacêutica consistem fundamentalmente num núcleo de óxido de ferro e num revestimento derivado de compostos orgânicos. Existem três tipos de óxidos de ferro que podem formar o núcleo de uma SPION: magnetite (Fe_3O_4), maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (5). A magnetite é predominantemente escolhida entre os restantes óxidos de ferro. Contém iões Fe^{2+} e Fe^{3+} na proporção 1:2. Esta proporção é importante, pois o Fe^{2+} , quando em solução, pode desencadear nas células a reação de Fenton, resultando na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (5). A maghemite, que é um dos produtos da magnetite, também apresenta propriedades magnéticas fortes. Por ter uma composição química idêntica à hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), é representada por $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (6). Com o passar do tempo, a magnetite pode ser oxidada em maghemite e quando submetida a altas temperaturas pode ser convertida em hematite (7).

A magnetite é considerada ferrimagnética no seu estado natural, a maghemite é ferromagnética e a hematite antiferromagnética. Apesar de terem propriedades magnéticas

diferentes, depois de formarem cristais suficientemente pequenos, todas elas se tornam superparamagnéticas (5). Ou seja, estas partículas são magnetizadas quando um campo magnético externo (CME) é aplicado e perdem a sua magnetização na ausência do mesmo (8). O efeito do superparamagnetismo está dependente do tamanho das NPs e é geralmente observado nas NPMs com dimensões até 100 nm (9).

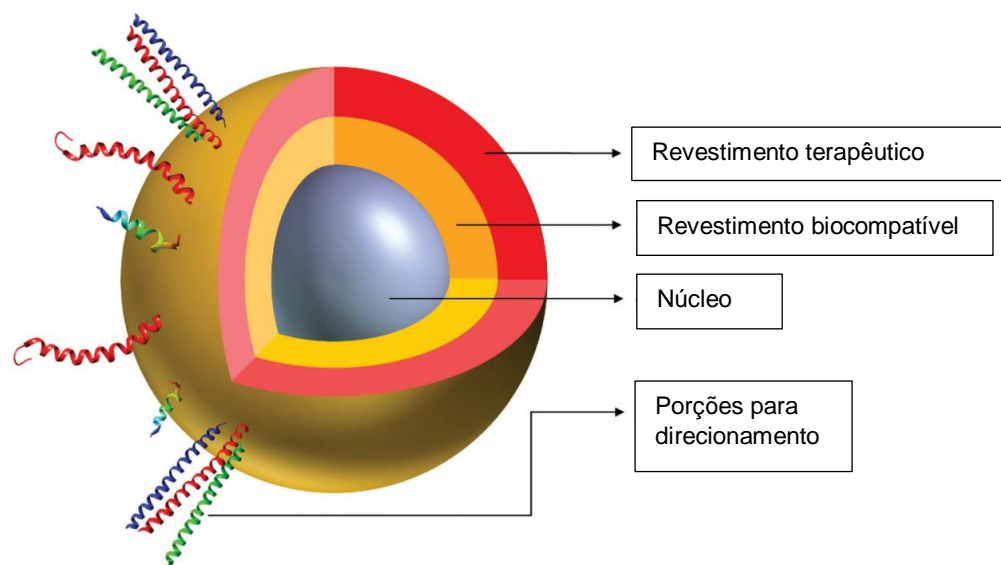


Figura 1: Representação esquemática de uma SPION com multicamadas, constituída por um núcleo, revestimento e porções para direcionamento, como pequenos ligandos, anticorpos monoclonais e aptâmeros, permitindo o reconhecimento pelos recetores correspondentes. Adaptado de (7)

O tamanho das SPION é uma característica fundamental pois, para partículas com tamanho inferior a 100 nm, permite uma menor sedimentação, uma maior superfície efetiva e uma melhor difusão tecidual. Para aplicações farmacêuticas, a faixa de diâmetro de 10 a 40 nm é a ideal para uma circulação sanguínea prolongada permitindo que as NPs escapem facilmente do sistema mononuclear fagocitário (MPS) e penetrem em capilares muito pequenos. As partículas com tamanho menor de 10 nm são removidas por depuração renal, enquanto que as maiores que 200 nm concentram-se no baço ou são fagocitadas por macrófagos, diminuindo a sua concentração plasmática (10,11). A propriedade

superparamagnética das SPION não depende apenas do tamanho do núcleo, mas também das modificações que podem ser feitas na superfície (7). Na ausência de qualquer revestimento, as SPION têm superfícies hidrofóbicas com uma grande área de superfície em relação ao volume (12). Desta forma, têm tendência para agregar e, quando injetadas na corrente sanguínea, são revestidas por proteínas plasmáticas (a chamada opsonização) e são rapidamente reconhecidas pelo MPS, resultando numa rápida eliminação (5,10). Este problema pode ser ultrapassado com um revestimento hidrofílico, pois este pode impedir ou diminuir significativamente a opsonização, evitar a agregação das NPs, levando a estabilidade coloidal em água, e também aumentar a biocompatibilidade, e permitir a formação de ligações com moléculas com atividade biológica (12). A estabilidade das partículas é dependente da carga superficial numa suspensão coloidal medida pelo potencial zeta. Apesar da maioria das NPs terem potencial zeta negativo, quanto mais positivo for o potencial de uma SPION, mais forte será a sua capacidade de se ligar a proteínas séricas (13). Para uma entrega eficiente de biofármacos usando SPION, é necessário garantir que a magnetização do transportador seja suficiente em resposta ao campo magnético aplicado. Ao mesmo tempo, é preciso garantir a penetração de biofármacos através das barreiras biológicas e a acumulação suficiente nos locais-alvo, mantendo a segurança para o tecido normal (14).

4.2 Síntese de SPION

Uma SPION típica possui dois componentes principais: (1) um núcleo de nanopartícula de óxido de ferro (IONP) que pode atuar como um agente transportador no tratamento do cancro e/ou agente de contraste na imagiologia por RM; (2) o revestimento da superfície, que pode auxiliar interações benéficas entre as SPION e a unidade biológica envolvida. Neste revestimento pode estar associado um ligando direcionador necessário para aplicações específicas *in vivo*, como a identificação de recetores sobreexpressos na superfície da célula cancerígena (7).

Para aplicações *in vitro* ou *in vivo*, existem vários aspetos cruciais a considerar, como o núcleo magnético e os ligandos à superfície, para garantir um desempenho adequado das nanoestruturas magnéticas quando elas interagem com meios biológicos, tais como fluídos ou tecidos, onde podem ser retidos (4). Dependendo do método utilizado as NPM podem ser sintetizadas com diferentes propriedades, como forma e tamanho, estrutura cristalina, propriedades magnéticas, dispersibilidade em água, estabilidade, etc (6).

A síntese pode ser realizada com base em abordagens físicas e químicas. A síntese química é geralmente aplicada quando se pretende preparar SPION com tamanho e composição uniformes (7). A escolha do melhor método de síntese depende principalmente da natureza das NPM que se deseja obter. Na tabela 1, encontram-se diversos métodos para a síntese das NPs (9,13).

Métodos	Detalhes
Co-precipitação	<ul style="list-style-type: none"> • SPION obtidas a partir de soluções aquosas de sais de Fe^{2+}/Fe^{3+}; • Vários parâmetros precisam de ser bem estabelecidos, como pH, razão Fe^{2+}/Fe^{3+}, temperatura, natureza do solvente, etc.
Decomposição térmica/hidrotérmica	<ul style="list-style-type: none"> • Síntese em meio aquoso a alta pressão e alta temperatura; • Melhora a taxa de nucleação e acelera o crescimento das novas partículas; • Reação de oxidação e hidrólise são as mais utilizadas; • Tem a vantagem de gerar partículas de pequeno diâmetro.
Sol-gel	<ul style="list-style-type: none"> • Este processo ocorre por quatro etapas: (1) Reações de hidroxilação e condensação geram uma suspensão coloidal das NPs (sol); (2) gelificação do sol para formar um gel; (3) envelhecimento; (4) secagem das partículas por sinterização; • Vários parâmetros precisam de ser bem estabelecidos, como pH, temperatura, natureza do solvente, etc; • A adição de surfactantes influencia a síntese da estrutura do gel 3D; • O principal inconveniente é a aglomeração durante a fase de lavagem e incapacidade de produzir partículas monodispersas.
Microemulsão	<ul style="list-style-type: none"> • As microemulsões são sistemas transparentes, isotrópicos e termodinamicamente estáveis; • O sistema consiste em dois líquidos imiscíveis, geralmente água e óleo, mais um surfactante; • As limitações do método incluem aglomeração, condições experimentais severas como alto consumo de solvente e baixo rendimento de NPs.

Biosíntese	<ul style="list-style-type: none"> • Método favorável ao meio ambiente, por gerar NPMs biocompatíveis; • A síntese de NPMS pode ser realizada usando agentes redutores, como fitoquímicos vegetais, enzimas microbianas, e bactérias; • O mecanismo da síntese biológica ainda não foi claramente elucidado e os parâmetros não podem ser modulados para a síntese de NPs com forma e tamanho controlados; • A maior desvantagem é a reduzida resposta magnética.
Sonólise	<ul style="list-style-type: none"> • Método baseado em ultra-som de alta intensidade; • O ultrassom gera bolhas de cavitação que podem ser usadas para transformar os reagentes em produtos desejados à temperatura ambiente; • O tamanho e a forma das SPION podem ser controlados através da regulação da temperatura de refluxo, potência e tempo de irradiação.

De entre os métodos de preparação de NPs citados anteriormente, pode-se destacar o método de co-precipitação. Este método apresenta inúmeras vantagens, tais como, a sua simplicidade e rapidez, custo de produção relativamente baixo, homogeneidade química, síntese de partículas pequenas e uniformes com fraca ou nenhuma aglomeração, fácil ampliação de escala. O método de co-precipitação consiste em dois processos: a nucleação (formação de centros de cristalização) e o crescimento subsequente das partículas (15).

De uma forma simples, este método envolve a reação dos sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} na proporção molar 2:1 em meio aquoso sob agitação vigorosa. Para uma precipitação efetiva das SPION, adiciona-se uma base, como NaOH (hidróxido de sódio) ou NH_4OH (hidróxido de amônia). O tipo de agente precipitante influencia as propriedades físico-químicas da SPION sintetizada (13). Verificou-se que as superfícies das NPs são ricas em grupos hidroxilo, o que as ajuda a dissolverem-se na água. A desvantagem deste método é o potencial de oxidação/redução dos sais de ferro utilizados, uma vez que afetam as propriedades físicas e químicas das NPs preparadas (7). Resumidamente, a síntese de NPs de magnetite tem de ser realizada num ambiente de gás inerte sob nitrogénio, para evitar a oxidação de Fe^{2+} em Fe^{3+} , ou seja, a oxidação de magnetite em maghemite (4,7).

Apesar dos novos métodos de produção de NPMs que vão surgindo para tentar superar as desvantagens dos estabelecidos anteriormente, para a produção em larga escala de recursos altamente controlados, a co-precipitação e a decomposição térmica/hidrotérmica continuam a ser os métodos mais seguros e fáceis de usar (9).

4.3 Toxicidade

Cada vez mais as NPs estão a ser sintetizadas para acompanhar o crescente e rápido avanço da nanomedicina. Todos os benefícios terapêuticos que as SPION têm a oferecer andam, sem dúvida, de mãos dadas com as preocupações associadas à exposição do doente aos mesmos.

Em 1996, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) o primeiro contraste de RM derivado de SPION. Com o passar do tempo, muitos outros produtos apareceram no mercado (por exemplo, Resovist, Lumirem e Feridex) no entanto, a maioria deles foi descontinuado devido a problemas de segurança. Surgiram preocupações sobre a alteração da função mitocondrial, o aparecimento de corpos apoptóticos, o aparecimento de ROS e os danos no ácido desoxirribonucleico (DNA). Atualmente, o único produto aprovado pela FDA é o ferumoxitol, usado no tratamento da anemia por deficiência em ferro, em doentes com doença renal crónica e usado *off-label* na RM, como agente angiográfico em pacientes com insuficiência renal (IR) (5).

Há, portanto, uma necessidade considerável de abordar as questões de biocompatibilidade e segurança associadas ao uso de SPION e os vários efeitos colaterais típicos de terapias que as envolvam. Estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a toxicidade destas NPs mostraram alguns resultados não concordantes. Por exemplo, resultados de estudos de toxicidade pulmonar feitos em ratos *in vivo*, demonstraram que, ao contrário do que foi observado nos mesmo estudos *in vitro*, as partículas de ferro produziram pouca toxicidade e causaram apenas respostas inflamatórias leves. Uma das explicações apontadas foi que durante ensaios *in vivo*, a capacidade de o organismo manter a homeostase (armazenando, por exemplo, o excesso de ferro) consegue reduzir os efeitos negativos provocados pelas SPION (5,16).

Os mecanismos de toxicidade provocados pelas SPION são parcialmente explicados pela produção de ROS, que causam stress oxidativo celular. Através da reação de Fenton, o ferro livre na forma de ião ferroso (Fe^{2+}) pode reagir com peróxido de hidrogénio e oxigénio, produzido pelas mitocôndrias, e criar radicais hidroxilo e iões férricos (Fe^{3+}) altamente reativos. Os radicais formados podem danificar o DNA, proteínas, lípidos e polissacarídeos na estrutura celular (10). A toxicidade dos nanosistemas é também influenciada pelas alterações no tamanho e na forma das NPs. As SPION em forma de bastão e tamanho nanométrico mostraram-se mais tóxicas do que as partículas em forma de esfera e

micrométricas, respetivamente (10). As NPs carregadas positivamente mostraram-se mais tóxicas, pois podem sofrer interações inespecíficas e endocitose com a membrana celular carregada negativamente, aumentando assim a sua acumulação intracelular e afetando a integridade da membrana celular (10). Apesar disto, o fator mais crítico para a toxicidade é a concentração de NPs no sangue.

Os estudos de revisão da citotoxicidade das SPION por Patil et al. (17) mostraram que estas não exibiram toxicidade em concentrações abaixo de 100 µg/mL, enquanto que em alguns casos a concentração de 250 µg/mL diminuiu consideravelmente a viabilidade celular (5). Para evitar a produção excessiva de ROS intracelulares de ferro, SPION revestidas com ácido láurico, uma proteína corona de BSA, ou dextrano foram desenvolvidas e demonstraram não provocar efeitos genotóxicos nas células da granulosa humana (10).

Outra razão possível de toxicidade associada às SPION é o seu revestimento. Relatórios sugerem o risco da presença de anticorpos anti-dextrano em indivíduos, após a administração de USPIO (*Ultrasmall superparamagnetic iron oxide*- sigla em inglês). No entanto, embora o dextrano continue a ser um dos materiais de revestimento mais usados em SPION, nenhuma reação anafilática foi relatada até o momento (5).

Assim, há uma necessidade crescente de realizar testes adicionais para aumentar o conhecimento sobre os efeitos tóxicos das SPION, tendo em conta que a sua toxicidade ainda não está devidamente descrita.

5. Formulações baseadas em SPION

A formulação adequada de SPION usando diversos materiais como polímeros e lipídios permite aumentar a taxa de resposta a CMEs e a acumulação de biofármacos nos locais de destino (14). Para tentar superar as limitações das SPION tais como, a penetração de biofármacos através de barreiras biológicas e a sua acumulação insuficiente nos locais-alvo, diversas estratégias têm sido exploradas para otimizar o comportamento das SPION. O revestimento na superfície permite obter estabilidade coloidal em meios aquosos. Polímeros naturais e sintéticos, surfactantes, ouro, sílica e peptídeos foram propostos como materiais de revestimento para SPION, alguns dos quais serão abordados de seguida (5). Para além da modificação da superfície, outras estratégias como, encapsular NPMs dentro de lipossomas (LP), micelas, hidrogéis e micro/nanoesferas, podem ser utilizadas para criar estruturas com propriedades físicas e químicas diferentes das NPs individuais e dos seus agregados (10).

- **Modificação de superfície**

Foram estabelecidas várias estratégias de síntese para alterar o tamanho, a morfologia e a homogeneidade das SPION. A modificação da superfície de NPMs, pode conferir versatilidade a diversas aplicações e permitir a entrega eficiente de fármacos. A superfície das SPION deve ser modificada para evitar a agregação das NPs, para obter biocompatibilidade, evitar a adsorção não específica em células, e permitir a formação de ligações com moléculas com atividade biológica (12).

Uma pesquisa cuidadosa na literatura mostra que, dependendo do alvo terapêutico das NPs, podem ser usados diferentes revestimentos para manter as SPION em circulação por um período maior ou menor. Também é possível diminuir o nível de toxicidade das SPION para as células ou tecidos selecionados e manipular o reconhecimento das SPION pelas células fagocitárias, diminuindo o grau de interação com as NPs (5).

O polietilenoglicol (PEG), um polímero frequentemente utilizado em várias formulações terapêuticas. É um material interessante, pois possui dois grupos funcionais finais de hidroxilo disponíveis para diferentes reações. O revestimento com PEG também tem sido utilizado para conjugação com fármacos, aumentando a solubilidade e a biodisponibilidade destes. As PEG-NPMs foram investigadas como transportadores de fármacos altamente biocompatíveis, como por exemplo, os antitumorais como curcumina e doxorrubicina (DOX) (9).

O poli (acetato de vinila) (PVA) é outro agente polimérico com estrutura semelhante ao PEG. É descrito como altamente biocompatível tendo em conta que os complexos PVA-SPION dificilmente são capturados pelas células (se não houver um campo magnético aplicado). Outra grande vantagem é a capacidade de impedir que as NPs sofram aglomeração dentro de vasos particularmente estreitos, cerca de 7 a 8 μm de diâmetro (5). A sílica é um dos materiais inorgânicos inertes preferidos usados para modificação da superfície, sendo que é um material hidrofílico que pode melhorar a estabilidade das SPION em solução aquosa, impedindo a sua agregação. Possui ainda um grupo funcional, silanol (Si-OH) que pode ser modificado com outros grupos funcionais ou fornecer um local de ligação para a bio-conjugação (13).

- **SPION em micelas**

Micelas são nanoestruturas que se formam espontaneamente, compostas por moléculas de tensoativo quando a sua concentração é superior à concentração micelar crítica (CMC). Fármacos hidrofóbicos são incorporados em núcleos de micelas através de interações hidrofóbicas. Do mesmo modo, NPMs num solvente não polar podem ser incorporadas nos núcleos hidrofóbicos das micelas, enquanto que biofármacos hidrofílicos podem ser fixados à superfície (14).

Este sistema tem várias vantagens, tais como, o aumento da solubilidade em água de fármacos pouco solúveis e, conseqüentemente, o aumento da sua biodisponibilidade, permeabilidade aprimorada através das barreiras fisiológicas e melhor biodistribuição de fármacos (18,19).

- **SPION Clusters**

Vários parâmetros estruturais, em particular o tamanho e a forma da partícula, podem ditar as propriedades magnéticas das SPION, o que é essencial para o sucesso da administração magnética de biofármacos. Para formar nanocristais com alta magnetização, o tamanho do cristal pode ser aumentado até 30 nm antes de perder o superparamagnetismo (14). A formação de *nanoclusters* através da ligação de NPs individuais de óxido de ferro tem o potencial de superar esta limitação aumentando os momentos magnéticos e, ao mesmo tempo, mantendo comportamentos superparamagnéticos (20).

A construção de nanocristais magnéticos por meio de um *crosslinker* polimérico, como ácido poliacrílico (PAA) ou polietilenoimina (PEI), pode produzir aglomerados de partículas com um tamanho acima de 100 nm. O tipo de *crosslinker* utilizado é determinado pelos biofármacos a serem administrados (14).

Estudos mostraram maior magnetização de SPION em *clusters*, em comparação com SPION individuais revestidas com polímeros. Este fenômeno pode ser explicado pela menor quantidade de polímero usado na formulação de *clusters*. Este resultado sugere que as SPION catiónicas em *clusters* podem ser preferíveis às SPION individuais revestidas por polímeros catiónicos para a detecção de genes *in vitro* (14).

- **SPION em hidrogeles**

Os hidrogeles são redes tridimensionais hidrofílicas capazes de reter grande quantidade de água e moléculas hidrofílicas. Têm sido extensivamente investigados e utilizados para administração de fármacos, devido à sua compatibilidade com tecidos e propriedades físicas bem estabelecidas. As SPION podem ser incorporadas em hidrogeles para intumescimento ou retração acionados magneticamente para administração de fármacos usando um CME (14).

Num estudo realizado, SPION com tamanho de 7 nm foram preparadas por um método de decomposição térmica e siRNAs foram encapsulados. Criaram-se hidrogeles que respondiam ao estímulo de pH, onde posteriormente incorporaram NPMs que mostraram resposta imediata a sinais magnéticos externos, permitindo a entrega intracelular eficiente e subsequente silenciamento de genes por siRNAs (21).

- **SPION em lipossomas**

Os lipossomas (LPs) são estruturas esféricas, compostas por uma ou mais bicamadas de lípidos (fosfolípidos) exterior, que rodeia um espaço interno aquoso (22). Têm várias características, incluindo biocompatibilidade e boa interação celular, que os tornam favoráveis para a administração de biofármacos. SPION revestidas com materiais hidrofílicos e hidrofóbicos e carregadas com biofármacos podem ser incorporadas e entregues por LPs. NPMs revestidas com polímeros hidrofílicos podem ser carregadas dentro do núcleo dos LPs ou fixadas à superfície dos LPs por meio de interações iônicas (14).

Num estudo anterior, NPMs revestidas com *palmityl-nitroDOPA* foram incorporadas com sucesso em LPs. Neste estudo, as NPMs elevaram significativamente a temperatura dos

LPs pela exposição a um campo magnético alternado (CMA) de alta frequência, levando à rutura dos mesmos e à libertação dos fármacos encapsulados (23).

- **SPION em micro/nanoesferas**

NPMs encapsuladas dentro de micro/nanoesferas podem ser manipuladas em função do comportamento farmacocinético desejado e transportar fármacos para tecidos e células alvo com base nas propriedades físicas das NPs. Num estudo prévio em modelos de coelho, microesferas com tamanho de 32 μm , compostas por poliésteres e SPION, mostraram acumular 3,5 vezes mais ferro no tecido tumoral do fígado do que no tecido normal, após infusão arterial hepática e exposição a campos magnéticos por vinte minutos. A acumulação de ferro no tumor levou à redução do volume tumoral através da hipertermia arterial (14).

Ajustando o tamanho das micro/nanoesferas encapsuladas com SPION, tanto as SPION quanto os biofármacos podem ser entregues de forma seletiva a células e tecidos específicos. Micro/nanoesferas associadas a SPION podem ser adsorvidas em superfícies de células terapêuticas, como células estaminais. Como portadores de tamanho nano podem ser internalizados em regiões intracelulares pelo efeito de permeação e retenção aprimorada (EPR) após administração sistémica (14).

6. Aplicações clínicas

Como foi discutido anteriormente, as NPMs possuem características muito importantes, como superparamagnetismo, tamanho e a possibilidade de receber um revestimento biocompatível. Assim, podem ser usadas para aplicações farmacêuticas para separação e detecção de células, reparação de tecidos, hipertermia magnética, administração de fármacos, entre outros (10). A pesquisa e o desenvolvimento de sistemas terapêuticos de **vetorização de fármacos** aumentaram com o desenvolvimento de novos materiais e tecnologias (10). No caso do cancro em particular, tornou-se uma das estratégias mais populares, pois pode levar a um aumento substancial na eficiência do tratamento e tem muito menos efeitos colaterais do que os métodos convencionais utilizados (9). As SPION têm sido alvo de testes para provar que podem ser implementadas como *drug carriers* (transportadores de fármacos). A administração magnética de fármacos direcionados utiliza SPION alteradas para se ligar a estes. A *nanodrug* é então direcionada aos locais do tumor após a introdução de um campo magnético. Desta forma, a acumulação do fármaco na área-alvo pode otimizar o tratamento do cancro (7,24).

As propriedades das SPION e o sucesso na entrega de fármacos no local alvo são fortemente afetadas pela composição do revestimento externo, sendo que é vantajoso usar polímeros biocompatíveis, naturais ou sintéticos. Estes polímeros para além de serem responsáveis pelo encapsulamento de fármacos, bem como pela sua libertação sob condições ambientais apropriadas ou em resposta a estímulos externos, ajudam a proteger as NPs do reconhecimento pelo sistema imunológico (5,25). Estudos realizados entre três tipos de polímeros com cargas iónicas diferentes mostraram que o polímero catiónico é mais eficiente para entrega direcionada, uma vez que cobre completamente a superfície das partículas, reduzindo a sua toxicidade, permite melhor eficiência de carregamento de fármacos anti tumorais e não reduz significativamente a magnetização das partículas, permitindo o direcionamento para o destino sob a ação de um campo eletromagnético (9).

Uma ideia recente foi proposta para investigar uma interação entre SPION conjugadas com β -ciclodextrina (CD-SPION) e paclitaxel polimerizado (pPTX). Esta estrutura permitiu um transporte direcionado, potenciado pelo CME e uma atividade anti tumoral aumentada *in vitro* e *in vivo*. As elevadas propriedades magnéticas obtidas possibilitaram a utilização deste sistema em tumores localizados profundamente (26).

A **hipertermia magnética** refere-se a uma terapia, na qual o tratamento é desencadeado pelo calor na área afetada como por exemplo num tumor (7). Este procedimento é utilizado para proporcionar o aumento da temperatura devido à aplicação de um CMA externo que gera agitação em NPM inseridas em tumores, com o objetivo de causar a lise de células cancerígenas pelo aumento da temperatura até 42-45°C (7,27). Geralmente, o tratamento com hipertermia com NPM pode ser realizada de duas formas diferentes. A primeira consiste na administração das NPs diretamente na área do tumor. A segunda é por administração i.v. das NPs, fornecendo uma distribuição mais homogênea em todo o sistema circulatório e aquecendo somente a área a tratar. Se as partículas forem direcionadas para as células tumorais, por exemplo, usando anticorpos específicos, haverá uma grande acumulação de SPION não só à volta das células, mas também dentro das mesmas (5,28). A hipertermia magnética é muito vantajosa pois aquece a área restrita do tumor (10). A temperatura elevada ativa inúmeras vias que levam à destruição das células cancerígenas, principalmente por estas serem mais propensas ao aumento da temperatura (geralmente acima de 43 °C) (5).

Esta técnica foi aplicada com sucesso no tratamento de glioblastoma, mas mais recentemente, NPMs inaláveis foram aplicados no tratamento do cancro do pulmão de não pequenas células. Trata-se do uso de NPMs funcionalizados com o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que são direcionadas *in vivo* para destruição de células do cancro do pulmão por hipertermia magnética (9).

Considerando as características das SPION, elas também podem ser utilizadas na terapia da doença de Alzheimer. NPMs de Fe₃O₄ podem interagir com lisozimas amiloides *in vitro*, reduzindo os agregados amiloides e promovendo a despolimerização (10). O mecanismo provável de ação antiagregante propõe que as moléculas de lisozima são adsorvidas e aderem às NPs. Consequentemente, há uma diminuição significativa na concentração de moléculas de lisozima livre, o que dificulta o processo de nucleação e a fibrilogénese (5). São necessárias investigações adicionais para explorar os mecanismos moleculares detalhados da capacidade anti-amiloidogénica das partículas.

O controlo remoto do movimento das NPs pode ter implicações de grande alcance em várias áreas da nanotecnologia e pode ser outra maneira de induzir a apoptose de células tumorais. Foi relatado que SPION conjugadas com anticorpos direcionados para o marcador da proteína lisossomal LAMP1 (LAMP1-SPIONs) giram num campo magnético dinâmico e causam danos à membrana lisossomal das células tumorais de insulinooma de rato. Esse distúrbio aumentou a expressão de marcadores apoptóticos precoces e tardios e reduziu o crescimento celular (5).

Curiosamente, estas NPs também podem ser vantajosas na terapia fotodinâmica (TFD). A TFD é definida como uma reação fotoquímica utilizada com o objetivo de causar destruição seletiva de um tecido. Nesta técnica há uma primeira etapa, onde a utilização de um fotossensibilizador, tópico ou sistêmico, é seguida da irradiação de uma luz visível. Os fotossensibilizantes, administrados exogenamente ou formados endogenamente, são ativados pela luz e transferem energia ao oxigênio molecular, gerando ROS que provocam a morte celular (29). A combinação do direcionamento magnético de fármacos e a TFD pode ser realizada através do revestimento de SPION com dextrano para impedir a agregação e permitir a ligação da hipericina (fotossensibilizador) aos seus grupos hidroxilo. Esta estratégia pode aumentar a seletividade e reduzir os efeitos colaterais da TFD, pois a terapia ocorre apenas no local onde as SPION se acumulam através de um ímã externo, sob a influência de radiação produzida por um laser (5,10).

A **entrega de genes** é um processo terapêutico para a entrega de ácidos nucleicos em vez de fármacos, com o objetivo de tratar doenças. Em geral, é um grande desafio entregar fármacos biológicos como siRNA e DNA plasmídico para atingir células ou tecidos sem ser danificado por nucleases, deste modo, a utilização de SPION como transportadores pode facilitar o transporte de genes e a libertação nos locais de destino pretendidos (1). Magnetofecção é um método comumente usado para transfeção não viral. O DNA plasmídico forma complexos com partículas magnéticas, que posteriormente são inseridos nas células através do uso de um campo magnético. Neste sistema de entrega de genes, NPMs podem ser conjugadas com ácidos nucleicos, carregados negativamente, através de interações eletrostáticas ou com PEI com carga positiva (7).

A RM destaca-se de vários métodos de visualização da anatomia *in vivo*, devido à qualidade de imagem e por ser pouco invasiva. No entanto, ainda é limitada pela resolução insuficiente (5). Os **agentes de contraste**, incluindo aqueles baseados em NPMs, são usados para melhorar a qualidade das imagens de RM. O desenvolvimento de NPMs reativas e de partículas magnéticas coloidais para imobilização e fácil separação magnética de biomoléculas é de grande importância para a detecção precoce de doenças e, conseqüentemente, na gestão da terapêutica e tratamento de cancro em estádios iniciais (9).

USPIO são uma nova categoria de agentes de contraste para RM que parecem desempenhar um papel crucial na imagem. São o menor tipo de SPION com diâmetros de partícula caracteristicamente menores que 20 nm. Estas partículas têm como vantagem o facto de não serem imediatamente removidas da circulação pelo MPS, resultando num tempo de semi-vida mais longo no sangue, numa biodistribuição mais ampla e num direcionamento para tecidos específicos utilizando bioconjugados apropriados. Os USPIO foram

desenvolvidos como agentes de RM para o fígado, baço e nódulos linfáticos. Mostraram também potencial para gerar imagens de tumores cerebrais e de placas ateroscleróticas ricas em macrófagos (30).

De seguida, será dado maior relevo a algumas aplicações clínicas das SPION nomeadamente ao seu uso como transportador de genes, como agente de contraste e como agente de teragnóstica.

6.1 SPION como transportador de genes

A utilização de conjuntos de NPs no campo biomédico (especialmente em aplicações *in vivo*) requer baixa citotoxicidade e imunogenicidade. Como tal, bio macromoléculas como polissacarídeos, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos, podem atuar como ligantes estruturais em conjuntos de NPs (31).

O DNA de cadeia simples (ssDNA) pode formar a conformação de dupla hélice ao hibridar com a sua cadeia complementar através de um mecanismo de emparelhamento entre bases Watson-Crick. Ao incorporar o ssDNA projetado à superfície das NPs, uma ampla gama de montagens automáticas pode ser produzida (32). A descoberta de aptâmeros, uma família de ssDNA ou RNA (ácido ribonucleico) selecionados artificialmente para funcionarem como anticorpos, promove ainda mais a aplicação de conjuntos de NPs com DNA no campo biomédico devido à total compatibilidade entre os aptâmeros e estes conjuntos (31).

A estabilidade do DNA de cadeia dupla (dsDNA) depende de vários fatores, tais como, comprimento, tipo de sequência, concentração, temperatura e o valor do pH no ambiente. Quaisquer variações nestes fatores podem desencadear a rutura da estrutura de dupla hélice de dsDNA, desconectando as NPs conjugadas com DNA umas das outras (31).

A deteção de sequências alvo de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) despertou especial atenção devido à sua ampla aplicação em terapia genética, diagnóstico molecular, epigenética e rastreamento precoce de doenças malignas, como o cancro. É desejável uma deteção altamente sensível e específica, pois os níveis de DNA são escassos na maioria das amostras de diagnóstico. Nas últimas décadas, várias plataformas eletroquímicas de deteção de DNA/RNA foram desenvolvidas com elevada seletividade e excelente sensibilidade (33).

Atualmente, várias moléculas de ácidos nucleicos como, DNA, RNA, nucleotídeos modificados, estão a ser utilizados em tentativas de terapia genética. Os miRNAs são

pequenas moléculas de RNA (18-21 nucleotídeos) não codificante que, pós-transcricionalmente, regulam os principais eventos biológicos, incluindo proliferação celular, diferenciação e sobrevivência, atuando como um potencial biomarcador de diagnóstico e prognóstico de várias doenças. Os miRNAs modulam os níveis celulares e a tradução de dezenas de RNAs mensageiros, controlando a abundância dos seus produtos proteicos (33,34). No corrente ano, Unal O., et al. propôs pela primeira vez o uso da proteína Argonauta 2 (AGO2) pertencente ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complexes*) como um agente estabilizador de miRNA e do veículo de entrega. Neste estudo, foram desenvolvidas NPs de SPION ligadas ao anticorpo anti-HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*) e conjugadas com a proteína AGO2, usadas como transportadoras de um miRNA inibidor da autofagia, MIR376B. Estas NPs funcionalizadas (nanopartículas SP-AH) entregaram seletivamente uma quantidade eficaz de miRNA nas linhas celulares de cancro da mama HER2 positivo *in vitro* e num modelo *in vitro* de um xenoinxerto de ratinhos com cancro da mama, bloqueando com sucesso a autofagia. Desta forma, a combinação de NPs SP-AH carregadas com MIR376B, com um fármaco usado para quimioterapia revelou o potencial inovador como agente adjuvante no tratamento do cancro (34).

Outra estratégia promissora que deu esperança ao tratamento de várias doenças é baseada no uso de small interfering RNA (siRNA), moléculas de RNA de cadeia dupla de 21 a 25 nucleotídeos de comprimento, que podem causar regulação negativa específica de proteínas através de RNA interferente, induzindo a degradação do mRNA ou a inibição da tradução. Para o tratamento do cancro, esta estratégia é usada para induzir a regulação negativa de genes que codificam proteínas envolvidas na proliferação de células cancerígenas e no crescimento tumoral. O uso de siRNA tem grandes vantagens, como o elevado grau de segurança, alta eficácia, escolha ilimitada de alvos e especificidade. No entanto, a sua aplicação é limitada pelo reduzido tempo de semi-vida, falta de biodistribuição específica e baixa permeabilidade da membrana (35,36).

A terapia genética é uma técnica experimental que utiliza genes para tratar ou prevenir doenças. Para que se desenvolvam sistemas de entrega sistémica inovadores e eficazes visando melhorar a terapia génica, têm de ser superados desafios atuais que incluem um envolvimento significativo de tempo e custo com taxas de sucesso muito baixas (35,37).

O sistema de entrega através de um CME utiliza as SPION como transportadoras para facilitar a entrega rápida extracelular, intracelular, específica e direcionada de biofármacos. Conforme a Figura 2A, as SPION podem acumular numa determinada área através de um campo magnético forte. Desta forma, os biofármacos associados a SPION podem ser orientados e retidos em locais específicos de tecidos ou órgãos, melhorando a especificidade

do alvo e a eficácia terapêutica. A presença de um campo magnético pode reduzir de forma significativa o tempo de transporte de genes para as células, sendo que em quinze minutos a maioria das NPMs consegue ser absorvida por células cancerígenas (Fig.2B). Um campo magnético externo pode ainda acelerar a captação celular de NPs em sistemas de cultura bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) *in vitro*. Através de um modelo de célula de hidrogel 3D (células de fibroblasto humano), o CME permitiu a penetração de NPMs revestidas com peptídeos de penetração de células até uma profundidade de 700 μm em géis de colagénio a uma taxa de 33 $\mu\text{m}/\text{h}$, que mediou a captação intracelular de NPMs em células de fibroblastos, mesmo em áreas profundas (Fig. 2C) (14).

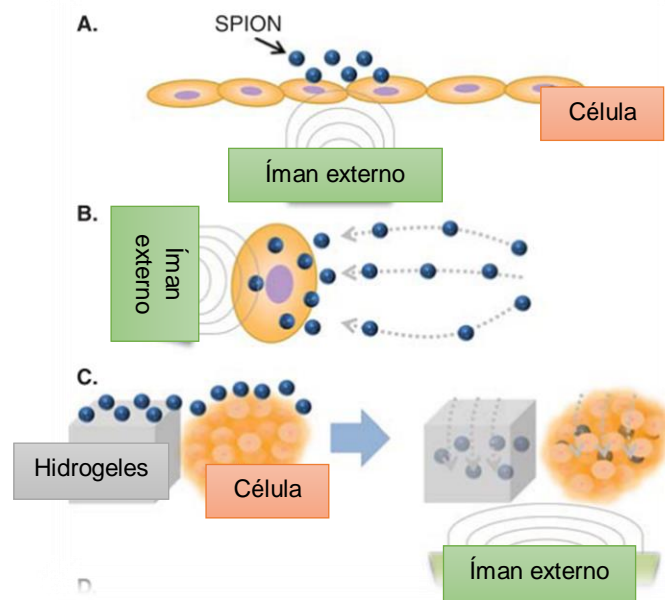


Figura 2: Representação esquemática da entrega de biofármacos acionada magneticamente. A. Acumulação/retenção local de SPION nos locais-alvo (tecidos e células) sob a influência de um ímã externo. B. Sedimentação rápida e entrega intracelular eficaz de SPION. C. Penetração de SPION em vários modelos de 3D, como hidrogéis e agregados celulares. Adaptado de (14).

Desta forma, a pesquisa concentra-se no desenvolvimento de sistemas vetoriais virais e não virais seguros e eficazes. Apesar de os vetores virais possuírem alta eficiência de transdução, são afetados por questões como não especificidade, imunogenicidade para células-alvo, toxicidade e degradação enzimática. Sistemas de entrega não virais estão a ser

adotados para facilitar a transferência terapêutica de genes na clínica (38). A magnetofecção é um método usado para transfeção não viral. Após a aplicação de um campo magnético, NPs ligadas a ácidos nucleicos podem atingir as células. A maioria dos sistemas de entrega de genes utiliza simultaneamente polímeros carregados positivamente e o efeito esponja de protões, para libertar o complexo óxido de ferro-polímero-ácido nucleico dos lisossomas para o citoplasma (7). Os sistemas não virais mais amplamente utilizados são complexos formados pela interação eletrostática de ácidos nucleicos com lipídios catiónicos (lipoplexes) e/ou polímeros catiónicos (poliplexos). Esta técnica de transfeção não viral tem sido alvo de estudo para diversos tipos de tumores.

Balcells L. et al., desenvolveram NPs multicomponentes compostas por polímeros de poli(β -aminoéster) (pBAE), DNA plasmídeo e SPION. Vários estudos consideraram os pBAEs portadores seguros e biocompatíveis com eficiência de transfeção aprimorada, em comparação com os vetores comerciais. As SPION foram utilizadas devido ao seu caráter magnético que permite a seleção de células. Surpreendentemente, os resultados apresentados revelaram um efeito estimulador inesperado das SPION na eficiência de transfeção de poliplexos pBAE/pDNA em linhas celulares permissivas e relutantes (39).

Foi relatada neste estudo uma relação sinérgica entre pBAEs e SPION, no sistema pBAE/pDNA/SPIONs, ou seja, as SPION ajudam os pBAEs na transfeção, enquanto que pBAEs ajudam as SPION na internalização celular. Além disso, a presença de SPION nos poliplexos permitiu não apenas o aumento imprevisto da transfeção celular, como também a separação magnética seletiva de células geneticamente modificadas, daquelas que não contêm DNA estranho. Tendo em conta que o enriquecimento da fração celular transfetada pode ser crucial para futuras aplicações clínicas de terapia celular, os resultados apresentados abrem a porta para NPs contendo SPION como ferramentas promissoras para abordagens de terapia celular (39).

O cancro da mama, o glioblastoma e o carcinoma hepatocelular (CHC) são dos carcinomas mais comuns e mortais que afetam o ser humano. A nanomedicina proporciona uma nova forma de abordar esta doença, usando as SPION para um diagnóstico não invasivo e inovadores métodos terapêuticos, que podem ser complementados com métodos já existentes como cirurgia, radioterapia, quimioterapia, entre outros (22). No caso do cancro da mama, este é o cancro mais comum e a principal causa de mortalidade por cancro em mulheres em todo o mundo. Aproximadamente 20% dos casos são causados pela sobreexpressão do HER2, sendo que muitos destes doentes não respondem apenas ao tratamento com o anticorpo monoclonal anti-HER2. O desenvolvimento de resistência e recorrência da doença continuam a ser um dos principais desafios, pois ocorrem em mais de

50% das doentes tratadas. A estratégia que utiliza siRNA é uma estratégia atraente e inovadora para inibir proteínas-alvo envolvidas na resistência ao tratamento (40). A aplicação bem-sucedida desta estratégia depende do desenvolvimento de *nanocarriers* para a entrega segura de siRNA no tecido doente, o que pode ocorrer por direcionamento direto ou passivo. O direcionamento passivo é conhecido como a acumulação de altas concentrações de NPs no local do tumor devido às diferenças fisiopatológicas entre tecidos normais e tecidos tumorais, ou seja, uma vez dentro do tecido tumoral, as NPs são retidas devido a vasos linfáticos pouco desenvolvidos, fenômeno este conhecido como o efeito de permeabilidade e retenção (EPR). No caso do direcionamento ativo dá-se através do reconhecimento molecular, por conjugação de porções de direcionamento na NP para obter entrega direcionada a células, tecidos ou órgãos específicos. Normalmente a entrega ocorre de forma passiva. A estratégia de direcionamento é possível porque as células cancerígenas expressam alvos moleculares diferentes (antígenos e/ou recetores) das células e tecidos normais, e enquanto algumas dessas moléculas são sub-reguladas, outras são recém-expressas ou significativamente reguladas na superfície das células-alvo (41). Estudos recentes têm como alvo diferentes alvos expressos nas células do cancro da mama e testam diversas técnicas de formulação, como a utilização de diferentes polímeros, para aumentar a capacidade de silenciamento de genes no tecido alvo.

Bruniaux J., et al, formulou *Targeted Stealth Magnetic siRNA nanovectors* (TS-MSN). O TS-MSN possui características físico-químicas adequadas para administração intravenosa e protege o siRNA contra a degradação enzimática até vinte e quatro horas. A presença de fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) direcionados a HER2 no TS-MSN permitiu uma internalização aprimorada (3-4 vezes mais em comparação com o S-MSN não direcionado) em células de cancro da mama com sobreexpressão de HER2. Assim concluiu-se que, TS-MSN são *nanocarriers* promissores para a entrega específica e eficiente de siRNA a células de cancro da mama com sobreexpressão de HER2 (40).

Outro fator sobreexpresso nas células do cancro da mama é o fator de crescimento vascular (VEGF), que promove a angiogénese para o crescimento e proliferação do tumor (42). Dalmina M., et al., em 2019, propôs um novo sistema de distribuição composto por SPION revestidas com fosfato de cálcio (CaP) e PEG-*polyanion block copolymers*, para tentativa de silenciar o VEGF. O sal inorgânico (CaP) pode facilmente ligar e encapsular polianiões e ácidos nucleicos, sendo eficaz como *nanocarrier*, enquanto fornece DNA e siRNA a uma ampla gama de células devido ao lento perfil de dissolução em meio ácido. No entanto, pode dar origem a partículas muito grandes. Esta desvantagem é ultrapassada pelo uso do PEG que forma uma camada na superfície do complexo, controlando e estabilizando o

tamanho das NPs. Este sistema mostrou que as NPs aumentaram o silenciamento do fator VEGF em células de cancro da mama *in vitro*, nos níveis de genes e proteínas (aproximadamente 60% e 40%, respetivamente), sem toxicidade associada (41).

Outra pesquisa demonstrou que as SPION funcionalizadas com CLA (ácido linoleico conjugado) são capazes de reduzir o número de células cancerígenas, induzir a morte celular e a inflamação nas células da mama 4T1 de ratinhos. Os resultados do estudo indicam que as propriedades anticancerígenas das SPION funcionalizadas com CLA são mediadas por PPARs (recetores ativados por proliferadores de peroxissoma), sendo as alterações nesses recetores nucleares correlacionadas com a indução de citotoxicidade, inflamação e diminuição da capacidade das células cancerígenas em bloquear o efeito de fármacos anticancerígenos (43).

Djemaa S., et al., desenvolveram nanovetores híbridos capazes de fornecer siRNA para células triplo-negativas de cancro da mama. Os nanovetores são baseados em SPION revestidas com PEG e funcionalizadas com o peptídeo gH625, quitosano (CS) e poli-L-arginina (PLR). Cada componente tem um papel fundamental e uma função específica: as SPION formam o núcleo do nanovetor; o PEG participa na estabilidade coloidal; o peptídeo gH625 promove a internalização de nanovetores nas células cancerígenas; os polímeros catiónicos fornecem a proteção do siRNA e favorecem a fuga e entrega endossómica de siRNA ao citosol. O Cs é conhecido pela sua segurança, biocompatibilidade e biodegradabilidade, demonstrando-se assim importante na entrega de siRNA e na eficiência da transfeção. A capacidade da PLR de se ligar ao siRNA aniónico e de complexá-lo com outros componentes de *nanocarriers* (como outros polímeros e/ou SPION) também foi relatada e amplamente explorada no desenvolvimento de nanossistemas de entrega de siRNA (36).

Diversos estudos enfatizaram que o uso de CS como polímero catiónico único apresenta limitações como agente de transfeção *in vitro* e *in vivo* de siRNA. Desta forma, a adição de outros polímeros catiónicos, representa uma interessante abordagem para superar a limitação relacionada com o CS (36,44).

No caso do glioblastoma, tumor altamente maligno do sistema nervoso, estudos mostraram que as células estaminais cancerígenas são uma das principais razões subjacentes à recorrência, metástases e ao mau prognóstico. Pan Z., et al., em 2020, isolou as células-tronco do glioma CD44 +/CD133 + (HuGSCs) a partir de tecidos seccionados cirurgicamente de pacientes. Resultados provenientes de qPCR (PCR em tempo real) e *Western Blot* mostraram uma expressão aumentada de Tie1 (*Tyrosine kinase with*

immunoglobulin-like and EGF-like domains 1) nas células HuGSCs. A hipótese de que Tie1 tem efeitos regulatórios importantes sobre a rigidez e malignidade das HuGSCs, levou ao uso da bioinformática para prever miRNAs que regulam Tie1 e à construção de complexos miRNA-SPION revestidos com PEI, para aumentar a eficiência de entrega e expressão em HuGSCs. Descobriu-se que miR-485-5p maduro complementa e emparelha completamente com sete bases num local específico em Tie1. Desta forma, os resultados mostraram que as SPION conduzem à sobreexpressão do miR-485-5p nas células HuGSCs e inibem eficientemente os níveis de expressão de Tie1 reduzindo a viabilidade *in vivo* e *in vitro* dos gliomas (45).

Outra molécula terapêutica que diminui a proliferação celular maligna no glioblastoma é o miRNA-128. No entanto, o miR-128 carece de estabilidade biológica e leva a uma fraca eficácia de administração em aplicações clínicas. Na tentativa de otimizar o uso desta molécula, Lo Y., et al., revestiu SPION com CP (*chondroitin sulfate-polyethylenimine copolymer*) formando CPIO para sistemas de entrega de genes. Na distribuição de miR-128, uma matriz de placas de miRNA e hibridização de fluorescência *in situ* foram usadas para demonstrar que o CPIO/pMIRNA-128 expressa mais miR-128 com a utilização de um campo magnético do que sem. Compararam também CPIO/DNA com PolyMag/DNA, sendo que esta última é uma combinação entre DNA e uma preparação de partículas magnéticas universalmente usada, exclusivamente em trabalhos de investigação, para entrega de ácidos nucleicos. Concluíram que CPIO/DNA é menos citotóxico e consegue transportar genes de forma mais eficiente que PolyMag/DNA. (46).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um tumor maligno com uma alta propensão à recorrência. Terapias convencionais, como a radiofrequência, não permitiram obter resultados satisfatórios, sendo urgente a necessidade de encontrar uma nova abordagem. O c-Met é o recetor do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e desempenha um papel importante na proliferação, motilidade, diferenciação e angiogénese no CHC, tendo sido associado a um "fenótipo metastático" e a um mau prognóstico. siRNAs direcionados a c-Met demonstraram eficácia na redução da expressão de c-Met e na inibição do crescimento tumoral. Assim, Yang Z. et al., projetaram partículas com um núcleo de óxido de ferro modificadas pela galactose (Gal) e polietilenimina (PEI), fornecendo uma entrega direcionada de siRNA às células tumorais. Os resultados deste estudo mostraram que Gal-PEI-SPIO encapsulado com siRNA é uma promessa para a terapia genética tumoral. Este complexo acumulou siRNA, direcionando-o especificamente para o tecido alvo, prolongou o tempo do siRNA no tumor e inibiu o crescimento do mesmo (47).

6.2 SPION como agente de contraste

A imagem por RM é, atualmente, um método de diagnóstico por imagem estabelecido na prática clínica e em crescente desenvolvimento. Dada a alta capacidade de diferenciar tecidos, o espectro de aplicações estende-se a todas as partes do corpo humano e explora aspectos anatômicos e funcionais (48).

Este método utiliza as propriedades magnéticas dos prótons para projetar a imagem. Quando nenhum momento magnético é aplicado, os prótons têm uma orientação aleatória, enquanto que, quando o campo magnético é ativado, dá-se um arranjo paralelo ou antiparalelo (nível de energia mais elevado). Os pulsos de radiofrequência conseguem provocar o salto dos átomos para outro plano e, quando o pulso é desligado, dá-se o processo de recuperação conhecido por relaxamento. O tempo de relaxamento varia de tecido para tecido e é usado para distinguir tecidos normais de patológicos. Cada tecido é caracterizado por dois tempos de relaxamento: T1 (longitudinal) e T2 (transversal). Os contrastes de RM melhoram a qualidade da imagem, influenciando o T1 ou T2 do tecido circundante (5,9). A eficiência de um agente de contraste é estudada em soluções aquosas, e é quantificada pela relaxividade, que pode ser longitudinal (r_1) ou transversal (r_2), e corresponde a uma medida de quanto aumenta, por unidade de concentração de um agente de contraste, o ritmo de relaxação dos prótons. Para o óxido de ferro, a campos magnéticos altos, a relaxividade transversal (r_2) é muito maior do que a relaxividade longitudinal (r_1) (49).

Os agentes de contraste diminuem os tempos de relaxamento T1 e/ou T2. As SPION comportam-se como agentes de contraste, interagem com as moléculas de água circundantes e aumentam a taxa de relaxamento das proteínas da água. Estas NPs são principalmente agentes de contraste T2 negativos. Quando acumuladas no tecido, reduzem o T2, diminuindo a intensidade do sinal e proporcionam um aumento negativo do contraste, ou seja, as regiões onde são capturadas são vistas mais escuras. Também é sugerido que, se as partículas das SPION forem pequenas o suficiente (<10 nm), como já referidas anteriormente USPIO, podem atuar como agentes de contraste positivo em T1 (5,50). Para aplicações de RM, as SPION geralmente são revestidas com PEG, PVA ou polissacarídeos naturais (dextrano e CS modificado) devido ao extenso tempo de prateleira destes materiais. O tipo de revestimento afeta o tempo de relaxamento. As moléculas hidrofílicas na superfície estabilizam as moléculas de água em torno das SPION e diminuem o T2 (5). Utilizou-se poli (D, L-lactido-co-glicolídeo) (PLGA) para encapsular SPION para aplicações *in vivo*. O PLGA aprimorou os efeitos de imagem com o aumento da semi-vida das NPs na corrente sanguínea e com a diminuição dos efeitos colaterais. O PEG é frequentemente vinculado ao PLGA para melhorar

a sua biocompatibilidade. Para atingirem o tecido específico, as SPION podem ser conjugadas com ligandos específicos de tumores, incluindo anticorpos e peptídeos e posteriormente, rastrear células tumorais (51). Shahbazi-Gahrouei D. et al., projetaram uma *nanoprobe* para imagens direcionadas do EGFR sobreexpresso no cancro das pequenas células do pulmão. As SPION foram revestidas com PEG e PLGA e conjugadas com um anticorpo monoclonal anti-EGFR. A imagem de RM mostra que o tempo de relaxamento em T2 diminui com um aumento na concentração de Fe, ou seja, a intensidade do sinal diminui com o aumento da concentração de Fe. O teste de suscetibilidade à RM mostrou que as *nanoprob*es possuíam alta relaxividade (r_2), o que ajuda a aumentar a sensibilidade para a detecção de anormalidades, como o cancro. Assim, este é um efeito útil para a RM porque permitiu reduzir a dose e aumentar a sensibilidade (51).

Apesar do crescente potencial das SPION como agentes de contraste, os agentes de contraste à base de gadolínio (GBCAS) são usados diariamente em aplicações clínicas de RM. Contudo, o uso destes pode trazer complicações, como o caso da fibrose sistémica nefrogénica (NSF), que se caracteriza por uma complicação grave associada ao uso de GBCAS, em doentes com IR (52). O gadolínio (Gd) é um metal muito tóxico e pode precipitar em vários tecidos e bloquear o transporte de cálcio nas células musculares. Em indivíduos com função renal normal, este equilibra-se rapidamente entre o plasma e interstício, com semi-vida de duas horas e é eliminado através da filtração glomerular. Em doentes com IR avançada a farmacocinética dos complexos com Gd está alterada. Embora não provado, pacientes submetidos a transplante renal parecem apresentar uma melhoria do quadro de FSN (53).

Na tentativa de aumentar o uso das SPION, vários estudos tentam conjugá-las com Ab específicos para tumores para ganharem especificidade ao direcionarem as células tumorais nas técnicas de imagem. Por exemplo, têm sido usados na imagem do CHC. As SPIONs são absorvidas pelas células Kupffer, um tipo de células reticulo endoteliais do fígado que têm função fagocitária. Como os cancros metastáticos do fígado não possuem células Kupffer, as metástases hepáticas não absorvem as SPION e, portanto, aparecem hiperintensas em relação ao fígado circundante. Esta propriedade torna as SPION particularmente eficazes na detecção de cancros metastáticos do fígado. Apesar disto, agentes de contraste hepatobiliares baseados em Gd têm uma capacidade aprimorada de detetar lesões hepáticas e continuam a ser os mais usados (52).

O EGFR desempenha um papel importante no desenvolvimento de diferentes tipos de cancro. Chen et al. construíram com sucesso o agente de imagem molecular C225-USPIO,

capaz de atingir o EGFR das células A549 do cancro do pulmão. C225-USPIO mostrou boa segmentação e especificidade, levando a uma redução significativa no valor de T2 em RM. Os resultados indicam que estes agentes de contraste molecular podem fornecer uma nova abordagem para medir os níveis de EGFR. Liu et al. também descobriram que o C225-USPIO tem potencial para ser usado como agente de contraste de RM para detetar de forma não invasiva, carcinoma nasofaríngeo em estágio inicial com sobreexpressão de EGFR. Além disso, Shevtsov et al. estudou SPION associadas ao EGF (SPION-EGF) como um potencial agente para aumentar o contraste em RM em tumores cerebrais malignos. Os resultados indicaram que a acumulação das SPION conjugadas foi mais eficiente do que com as SPION não conjugadas (52).

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é um marcador tumoral sobreexpresso em muitos cancros humanos, particularmente no trato gastrointestinal. Vigor et al. propôs que as SPION poderiam ser usadas para a obtenção e geração de imagens de células cancerígenas se fossem funcionalizadas com scFv. Assim, geraram SPION funcionalizadas com anticorpos (abf) usando um scFv específico para CEA. Os resultados demonstraram que o abf-SPION ligava-se especificamente às células tumorais humanas que expressavam CEA, gerando um contraste seletivo na imagem por RM (52).

A mesotelina é uma proteína expressa nas membranas das células de várias neoplasias, como o adenocarcinoma do pâncreas. Estudos comprovaram que a ligação de SPION ao Ab anti-mesotelina (A-MSF) forma um complexo capaz de identificar células de carcinoma pancreático através da RM. Nas imagens ponderadas em T2, o sinal do tumor diminuiu após a administração de A-MSF-SPIONs. Mahajan S et al, verificou ainda que a associação de micelas de folato a SPION, levam a uma diminuição da intensidade de sinal em células HeLa. Observou-se maior internalização das formulações de SPION-micelas conjugadas com folato do que as micelas não conjugadas. Esta característica torna as SPION de folato um bom agente de contraste T2 nesta população celular (50).

6.3 SPION como agentes de teragnóstica

A associação da funcionalidade das SPION como transportadores de genes e como agentes de contraste, permite acompanhar de forma não invasiva o efeito da terapia genética e obter um efeito terapêutico ideal. A SPION foi aplicada para visualizar a área alvo no tumor em combinação com a RM e avaliar o efeito do diagnóstico e tratamento devido à alta resolução espacial e temporal da imagem. E, recentemente, descobertas mais detalhadas revelaram a viabilidade das SPION na terapia genética visível por RM.

Song X. et al., prepararam LPs com SPION revestidas com PEI tendo como função o diagnóstico por RM e a terapia genética. O uso de LPs promove a captação celular dos complexos, e a polietilenamina (PEI) permite a complexação com ácidos nucleicos carregados negativamente e a interação com a membrana celular devido à sua carga positiva, melhorando o transporte intracelular de DNA. Assim, a sinergia entre ambos demonstrou ser mais eficiente na entrega de genes. Os resultados indicam que o tamanho relativamente pequeno do complexo LP-PEI-SPION/DNA foi favorável à terapia génica de tumores, pois é eliminado mais lentamente da circulação sanguínea. LP-PEI-SPION tinha a capacidade de entregar genes nas células e expressá-los em proteínas. Como as SPION são agentes de contraste para RM ponderados em T2, provocaram a redução de intensidade de sinal. A captação diferente de LP-PEI-SPION/DNA pelas células, e as imagens mais escuras ponderadas em T2 revelaram a maior eficiência de LP-PEI-SPION/DNA nas células dos tumores. Verificou-se que a intensidade do sinal diminuiu com o aumento da razão de peso de LP-PEI-SPION/DNA, especialmente para células HepG2. LP-PEI-SPION mostrou ainda alta eficiência de transfeção, semelhante ao agente de transfeção comercialmente disponível Lipofectamine 2000. Este reagente é um reagente de transfeção versátil normalmente usado para transfetar DNA de plasmídeos, bem como para experiências de *knockdown* de genes baseados em siRNA e *short hairpin* RNA (shRNA) e estudos de expressão de genes. Existem muitos desafios para aumentar o efeito da RM e reduzir a ligação não específica que se verifica noutros órgãos. Estes resultados sugerem que o LP-PEI-SPION possui alta sensibilidade à RM e pode ser usado como um promissor agente de contraste para RM (54).

O cancro colorretal é uma das principais causas de morte em todo o mundo. O SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina) é o metabolito biologicamente ativo derivado do cloridrato de irinotecano (CPT-11) que exibe citotoxicidade aproximadamente mil vezes mais alta contra várias células cancerígenas em comparação com o CPT-11. A aplicação clínica do SN-38 é limitada devido à sua baixa solubilidade. O siRNA anti-VEGF exibe grande potencial para a inibição da angiogénese (55). Sabemos também que, vetores não virais, como é o caso de

polímeros ou micelas catiónicas, e LPs foram relatados como bons portadores de siRNA que podem suprimir a expressão de genes-alvo com pouca imunogenicidade. Polímeros como o PEG podem ser conjugados com siRNA para melhorar ainda mais a sua estabilidade e prolongar o tempo de circulação sanguínea após a administração intravenosa (i.v). Baseados nestas informações Lee S. et al., desenvolveram um nano complexo multifuncional que utiliza micelas de PDMA-bloco-poli(ϵ -caprolactona) (PDMA-b-PCL). As micelas carregadas com SN-38/USPIO foram então complexadas com VEGF siRNA-PEG. Os complexos de siRNA-PEG carregados com SN-38/USPIO acumularam-se eficientemente no tumor através do efeito EPR (56).

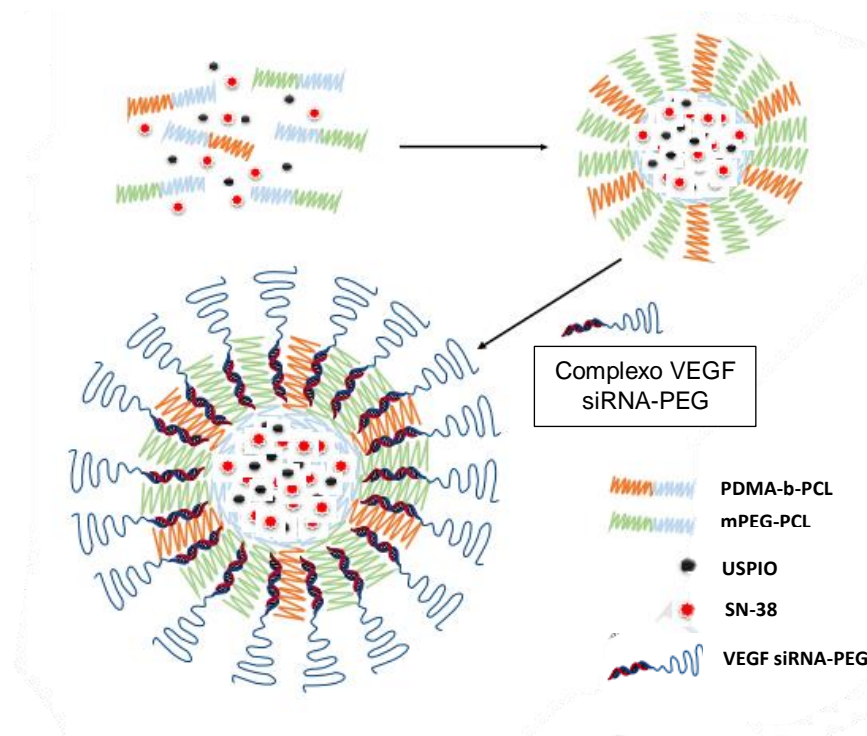


Figura 3: Complexos micelares multifuncionais de siRNA-PEG carregados com SN-38/USPIO. Adaptado de (55)

No presente estudo, a relaxividade T2 dependente da concentração de Fe sugeriu que as micelas magnéticas poderiam atuar potencialmente como um agente de contraste T2 na RM. Verificaram ainda que o contraste era mais negativo com a utilização das micelas magnéticas, pois estas contêm vários USPIO aglomerados no núcleo, em comparação com o contraste induzido pelas NPs USPIO dispersas. Tanto a conjugação do PEG como a formação

de complexos micelares de siRNA-PEG proporcionaram um efeito protetor que impede que o siRNA sofra degradação enzimática no plasma. Em suma, as micelas de PDMA-b-PCL podem ser aplicadas como transportadores para entrega de siRNA, e os consequentes complexos micelares de VEGF siRNA-PEG podem silenciar com eficiência a expressão de VEGF em células LS174T. Os complexos carregados com SN-38/USPIO mostraram uma eficácia antitumoral significativa *in vivo* com um duplo efeito terapêutico resultante da quimioterapia SN-38 e do siRNA do VEGF, que atuaram sinergicamente para suprimir o crescimento do tumor durante o tratamento. Para melhorar ainda mais a segurança e estabilidade *in vivo* dos complexos micelares carregados com SN-38/USPIO, prepararam micelas mistas usando o polímero mPEG-PCL juntamente com PDMA-b-PCL. Em conclusão, este sistema combinou o silenciamento dos genes e a quimioterapia, e também serviu como um agente de contraste negativo para a RM e, portanto, pode ser uma nova abordagem promissora à terapia do cancro colorretal (56).

7. Conclusão

Com o surgimento de biofármacos e através da descoberta das suas potenciais aplicações na clínica, o interesse pelo desenvolvimento de transportadores especializados tem aumentado. Neste sentido, as SPION surgem como uma estratégia promissora. A sua magnetização em resposta a um campo magnético pode ser usada para mediar a acumulação/retenção e facilitar a penetração de biofármacos através de tecidos e células tanto *in vitro* como *in vivo*. Desta forma, surge a possibilidade da entrega de fármacos direcionada especificamente aos locais da doença, minimizando os efeitos colaterais aos tecidos/órgãos sãos, permitindo assim um tratamento mais seguro e eficaz. Para que as SPION possuam propriedades mais desejáveis para administração de biofármacos, várias estratégias de formulação foram desenvolvidas, incluindo a modificação da sua superfície, clusters, hidrogéis encapsulados, LPs, micelas e micro/nanopartículas (14).

Têm sido feitos avanços significativos no desenvolvimento de entrega de genes baseados em SPION. Vários sistemas de transporte acionados magneticamente chegaram ao mercado. Apesar das descobertas encorajadoras, ainda é prematuro prever quando e qual a formulação de transportadores baseados em SPION apresenta maior segurança e eficácia para poder ganhar o seu espaço na clínica. Muito trabalho necessita de ser feito para que os resultados laboratoriais possam ser traduzidos para a prática clínica. A pesquisa aborda principalmente experimentação *in vitro*, e apenas recentemente, surgiram alguns estudos *in vivo* em modelos de pequenos animais. Em culturas de células e modelos de pequenos animais, os ímanes podem ser usados de forma a atingir células ou tecidos, e o campo magnético pode ser facilmente restringido a uma pequena área. Na clínica, no entanto, essa não é a situação comum. Para entrega não invasiva pode ser necessário um íman de grandes dimensões colocado distante do tecido alvo, trazendo assim um desafio ao uso clínico atual. Além disso, não está claro se a força magnética necessária para uma entrega eficaz é segura no ambiente clínico (14).

A entrega acionada magneticamente é direcionada principalmente para o tratamento de tumores sólidos e pode ser menos eficaz para o tratamento de células cancerígenas altamente invasivas, como as células multiformes de glioblastoma. Para as células cancerígenas, uma combinação entre a entrega acionada magneticamente e o direcionamento baseado em ligandos pode ser mais eficaz. Tal pode ser feito incorporando em SPION ligandos de direcionamento específicos das células da doença. Esses ligandos funcionam ao nível celular e permitem maior especificidade para o alvo. Para aperfeiçoar ainda mais a entrega acionada magneticamente, os transportadores baseados em SPION

também podem ser combinados com várias porções que respondem a outros estímulos externos, como ultrassons, temperaturas, pH e luzes, para elevar a eficiência da entrega direcionada e permitir a entrega programada de biofármacos (14).

Em suma, as SPION são altamente promissoras para a terapia genética, especialmente no tratamento do cancro. A investigação deverá ser ampliada para encontrar novos polímeros, melhorar os portadores de genes atualmente disponíveis e aplicá-los a uma gama mais ampla de tecidos, órgãos e doenças. Idealmente, num futuro próximo, os portadores baseados em SPION poderão ser utilizados como sistemas eficazes para entrega localizada de biofármacos sem efeitos colaterais significativos e com uma modalidade de monitoramento para avaliar os efeitos terapêuticos por RM (57).

8. Referências Bibliográficas

1. Vallabani NVS, Singh S. Recent advances and future prospects of iron oxide nanoparticles in biomedicine and diagnostics. *3 Biotech* [Internet]. 2018;8(6):1–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1286-z>
2. Kodama RH. Magnetic nanoparticles. Vol. 200, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1999. 359–372 p.
3. Hepel M. Magnetic Nanoparticles for Nanomedicine. *Magnetochemistry*. 2020;6(1):3.
4. Piñeiro Y, González Gómez M, de Castro Alves L, Arrosa Prieto A, García Acevedo P, Seco Gudiña R, et al. Hybrid Nanostructured Magnetite Nanoparticles: From Bio-Detection and Theragnostics to Regenerative Medicine. *Magnetochemistry*. 2020;6(1):4.
5. Dulińska-Litewka J, Łazarczyk A, Hałubiec P, Szafranski O, Karnas K, Karewicz A. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles— Current and Prospective Medical Applications. *Materials (Basel)*. 2019;12(4).
6. Gleicy L, Oliveira DS, Garg V, Santana GP. As nanopartículas de óxidos de ferro magnéticos na terapia do câncer 1. *Scientia Amazonia*. 2015;v.4(February):70–84.
7. Palanisamy S, Wang YM. Superparamagnetic iron oxide nanoparticulate system: synthesis, targeting, drug delivery and therapy in cancer. *Dalt Trans*. 2019;48(26):9490–515.
8. Leite ES. Estudo das propriedades magnéticas de nanopartículas de maghemita dispersas em óleos magnéticos isolantes. 2013;149.
9. Hosu, Tertis, Cristea. Implication of Magnetic Nanoparticles in Cancer Detection, Screening and Treatment. *Magnetochemistry*. 2019;5(4):55.
10. Bruschi ML, de Toledo L de AS. Pharmaceutical Applications of Iron-Oxide Magnetic Nanoparticles. *Magnetochemistry*. 2019;5(3):50.
11. Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:3445–71.
12. Asy'ari H. Modificação superficial de IONP por poli(ácido aspártico) reticulado. *Nhk技研*. 2015;151(september 2016):10–7.
13. Sodipo BK, Aziz AA. Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. *J Magn Magn Mater* [Internet]. 2016;416(May):275–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.05.019>
14. Mok H, Zhang M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-based delivery systems for biotherapeutics. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(1):73–87.
15. Bini R. Síntese e funcionalização de superfícies de óxido de ferro superparamagnéticos. *Aleph*. 2011;123 f. : il.
16. Singh N, Jenkins GJS, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*. 2010;1(1):5358.
17. Patil RM, Thorat ND, Shete PB, Bedge PA, Gavde S, Joshi MG, et al. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. 2018;13(December 2017):63–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.12.002>
18. Rana S, Bhattacharjee J, Barick KC, Verma G, Hassan PA, Yakhmi J V. Interfacial engineering of nanoparticles for cancer therapeutics [Internet]. *Nanostructures for*

- Cancer Therapy. Elsevier Inc.; 2017. 177–209 p. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3/00007-6>
19. Sun L, Joh DY, Al-zaki A, Stangl M, Murty S, Davis JJ, et al. Theranostic Application of Mixed Gold and Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Micelles in Glioblastoma Multiforme. 2016;12(2):347–56.
 20. Antone AJ, Sun Z, Bao Y. Preparation and Application of Iron Oxide Nanoclusters. *Magnetochemistry*. 2019;5(3):45.
 21. Curcio A, Marotta R, Riedinger A, Palumberi D, Falqui A, Pellegrino T. Magnetic pH-responsive nanogels as multifunctional delivery tools for small interfering RNA (siRNA) molecules and iron oxide nanoparticles (IONPs). *Chem Commun*. 2012;48(18):2400–2.
 22. Parreira DB. the Effect of Methyl Cellulose Based Active Edible Coatings on the Storage Life of Tomato. *Iran J Food Sci Technol*. 2012;9(35):89–98.
 23. Amstad E, Kohlbrecher J, Müller E, Schweizer T, Textor M, Reimhult E. Triggered release from liposomes through magnetic actuation of iron oxide nanoparticle containing membranes. *Nano Lett*. 2011;11(4):1664–70.
 24. Talluri S, Malla RR. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) for Diagnosis and Treatment of Breast, Ovarian and Cervical Cancers. *Curr Drug Metab*. 2019;20(12):942–5.
 25. Zheng XC, Ren W, Zhang S, Zhong T, Duan XC, Yin YF, et al. The theranostic efficiency of tumor-specific, pH-responsive, peptide-modified, liposome-containing paclitaxel and superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:1495–504.
 26. Jeon H, Kim J, Lee YM, Kim J, Choi HW, Lee J, et al. Poly-paclitaxel/cyclodextrin-SPION nano-assembly for magnetically guided drug delivery system. *J Control Release* [Internet]. 2016;231:68–76. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.006>
 27. Oliveira AC De. Hipertermia magnética. 2016.
 28. Kandasamy G, Sudame A, Luthra T, Saini K, Maity D. Functionalized Hydrophilic Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Fluid Hyperthermia Application in Liver Cancer Treatment. *ACS Omega*. 2018;3(4):3991–4005.
 29. Issa MCA, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: A review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol*. 2010;85(4):501–11.
 30. Zhao X, Zhao H, Chen Z, Lan M. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging contrast agent. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(1):210–20.
 31. Li F, Lu J, Kong X, Hyeon T, Ling D. Dynamic Nanoparticle Assemblies for Biomedical Applications. *Adv Mater*. 2017;29(14):1–30.
 32. Kishi JY, Schaus TE, Gopalkrishnan N, Xuan F, Yin P. Programmable autonomous synthesis of single-stranded DNA. *Nat Chem*. 2018;10(2):155–64.
 33. Masud MK nanoarchitectures for disease-specific biomarker detection, Na J, Younus M, Hossain MSA, Bando Y, Shiddiky MJA, et al. Superparamagnetic nanoarchitectures for disease-specific biomarker detection. *Chem Soc Rev*. 2019;48(24):5717–51.
 34. Unal O, Akkoc Y, Kocak M, Nalbat E, Isin A, Ekici D, et al. Treatment of breast cancer with autophagy inhibitory microRNAs carried by AGO2 - conjugated nanoparticles. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2020;1–18. Available from:

<https://doi.org/10.1186/s12951-020-00615-4>

35. Abdelrahman M, Douziech Eyrolles L, Alkarib SY, Hervé-Aubert K, Ben Djemaa S, Marchais H, et al. siRNA delivery system based on magnetic nanovectors: Characterization and stability evaluation. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2017;106:287–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.062>
36. Ben Djemaa S, David S, Hervé-Aubert K, Falanga A, Galdiero S, Allard-Vannier E, et al. Formulation and in vitro evaluation of a siRNA delivery nanosystem decorated with gH625 peptide for triple negative breast cancer theranosis. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2018;131:99–108. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.024>
37. Macavei SG, Suciu M, Crăciunescu I, Barbu-Tudoran L, Tripon SC, Leoştean C, et al. SPION size dependent effects on normal and cancer cells. *Stud Univ Babeş-Bolyai Biol*. 2017;62(1):29–42.
38. Sohrabijam Z, Saeidifar M, Zamanian A. Enhancement of magnetofection efficiency using chitosan coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calf thymus DNA. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2017;152:169–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.028>
39. Balcells L, Fornaguera C, Brugada-Vilà P, Guerra-Rebollo M, Meca-Cortés Ó, Martínez G, et al. SPIONs' Enhancer Effect on Cell Transfection: An Unexpected Advantage for an Improved Gene Delivery System. *ACS Omega*. 2019;4(2):2728–40.
40. Bruniaux J, Allard-Vannier E, Aubrey N, Lakhri Z, Ben Djemaa S, Eljack S, et al. Magnetic nanocarriers for the specific delivery of siRNA: Contribution of breast cancer cells active targeting for down-regulation efficiency. *Int J Pharm*. 2019;569(July).
41. Dalmina M, Pittella F, Sierra JA, Souza GRR, Silva AH, Pasa AA, et al. Magnetically responsive hybrid nanoparticles for in vitro siRNA delivery to breast cancer cells. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2019;99(January):1182–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.026>
42. Sullivan LA, Brekken RA. The VEGF family in cancer and antibody-based. 2010;165–75.
43. Ricci M, Miola M, Multari C, Borroni E, Canuto RA, Congiusta N, et al. PPARs are mediators of anti-cancer properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) functionalized with conjugated linoleic acid. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2018;292(April):9–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.003>
44. Bruniaux J, Djemaa S Ben, Hervé-Aubert K, Marchais H, Chourpa I, David S. Stealth magnetic nanocarriers of siRNA as platform for breast cancer theranostics. *Int J Pharm* [Internet]. 2017;532(2):660–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.022>
45. Pan Z, Huang Y, Qian H, Du X, Qin W, Liu T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles drive miR-485-5p inhibition in glioma stem cells by silencing Tie1 expression. *Int J Biol Sci*. 2020;16(7):1274–87.
46. Lo YL, Chou HL, Liao ZX, Huang SJ, Ke JH, Liu YS, et al. Chondroitin sulfate-polyethylenimine copolymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as an efficient magneto-gene carrier for microRNA-encoding plasmid DNA delivery. *Nanoscale*. 2015;7(18):8554–65.
47. by Dove Press published. SPION modified with PEI and Galactose for siRNA targeted delivery in hepatocellular carcinoma therapy. 2018;1851–65.
48. Mazzola AA. Ressonancia magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional. *Rev Bras Física Médica*. 2009;3(1):117–29.
49. Meixedo DCP. Estudo da potencial utilização como agente de contraste em Imagem

por Ressonância Magnética de novos magnetolipossomas. 2012;82. Available from: <http://hdl.handle.net/10362/8223>

50. Frantellizzi V, Conte M, Pontico, MarianoNew Frontiers in Molecular Imaging with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Efficacy, Toxicity and FA, Pani A, Pani R, De Vincentis G. New Frontiers in Molecular Imaging with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Efficacy, Toxicity, and Future Applications. Nucl Med Mol Imaging (2010). 2020;
51. Salehnia Z, Shahbazi-Gahrouei D, Akbarzadeh A, Baradaran B, Farajnia S, Naghibi M. Synthesis and characterisation of iron oxide nanoparticles conjugated with epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody as MRI contrast agent for cancer detection. IET Nanobiotechnology. 2019;13(4):400–6.
52. Zhang C, Yan Y, Zou Q, Chen J, Li C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging of pancreatic cancer: Potential for early diagnosis through targeted strategies. Asia Pac J Clin Oncol. 2016;12(1):13–21.
53. Mundim JS, Lorena S de C, Abensur H, Elias RM, Moysés RMA, de Castro MCM, et al. Fibrose sistêmica nefrogênica: Uma complicação grave do uso do gadolínio em pacientes com insuficiência renal. Rev Assoc Med Bras. 2009;55(2):220–5.
54. Song X, Yan G, Quan S, Jin E, Quan J, Jin G. MRI-visible liposome–polyethylenimine complexes for DNA delivery: Preparation and evaluation. Biosci Biotechnol Biochem [Internet]. 2019;83(4):622–32. Available from: <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1562875>
55. Germain ARD levine susan hanson maureen. Next Generation Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cancer Theranostics. Physiol Behav. 2017;176(3):139–48.
56. Lee SY, Yang CY, Peng CL, Wei MF, Chen KC, Yao CJ, et al. A theranostic micelleplex co-delivering SN-38 and VEGF siRNA for colorectal cancer therapy. Biomaterials [Internet]. 2016;86:92–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.068>
57. Mulens V, Morales M del P, Barber DF. Development of Magnetic Nanoparticles for Cancer Gene Therapy: A Comprehensive Review. ISRN Nanomater. 2013;2013:1–14.