1ST EDITION | VOLUME 1 | ISSUE 1
2022, AUGUST - DECEMBER | Mário Penna Journal

Mini Review

USO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER:DA RADIOTERAPIA À TERAPIA GENÉTICA

USE OF NANOSTRUCTURED SYSTEMS IN THE TREATMENT OF CANCER: From Radiotherapy to Gene Therapy

Jony Marques Geraldo
Departamento de Anatomia e Imagem/UFMG, Hospital Luxemburgo, Hospital Alberto Cavalcanti/FHEMIG
ORCID: 0000-0002-0470-0691
jonymg@medicina.ufmg.br

Carlos Julio Montaño Valencia
Departamento de Engenharia Nuclear/Escola de Engenharia/UFMG
ORCID: 0000-0001-7125-9982
carlmont@ucm.es

RESUMO

Intensa pesquisa foi deslocada para integrar a nanotecnologia no tratamento do câncer, face aos resultados insatisfatórios das abordagens terapêuticas tradicionais. A nanomedicina, campo sobreposto da nanotecnologia e da medicina, traz uma série de vantagens sobre a terapêutica convencional do câncer, incluindo radiosensibilização, multifuncionalidade, eficiência na entrega de drogas e liberação controlada de agentes quimioterápicos. Dentre as várias frentes de ação que têm sido seguidas, também a terapia gênica surge como uma proposta promissora como suporte ao tratamento do câncer, podendo ainda se aliar a sistemas nanoestrutrados para trazer um efeito sinergético, proporcionando bloqueio de marcadores metastáticos para aumentar a expectativa de vida em pacientes com estadiamento mais avançados.

Palavras-chave: Câncer; nanomedicina; terapia gênica.

ABSTRACT

Intense research has been shifted to integrate nanotechnology into cancer treatment, in the face of unsatisfactory results from traditional therapeutic approaches. Nanomedicine, an overlapping field of nanotechnology and medicine, brings several advantages over

conventional cancer therapy, including radiosensitization, multifunctionality, efficiency in drug delivery and controlled release of chemotherapeutic agents. Among the various fronts of action that have been followed, gene therapy also emerges as a promising proposal as a support for cancer treatment and may also combine with nanostructured systems to bring a synergistic effect, providing blocking of metastatic markers to increase the expectation of life in more advanced stage patients.

Keywords: Cancer; nanomedicine; gene therapy.

Data de submissão: 31/10/2022.

Data de aprovação: 18/11/2022.

1. INTRODUÇÃO

O câncer tem sido a segunda causa de morte no Brasil, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Segundo dados do Ministério da Saúde foram registrados 626.030 novos casos no ano de 2020. Sabe-se que um a cada três adultos desenvolverá algum tipo de neoplasia e a situação a nível mundial não é muito diferente [(1)]. O câncer é caracterizado por uma multiplicação acelerada de células anormais, que, ao atingir um certo volume, comprimem e invadem os tecidos normais adjacentes, podendo ocorrer metástases à distância e levar o indivíduo à morte. Há, atualmente, mais de 200 tipos de câncer histologicamente reconhecidos, sendo os tratamentos mais comuns: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. Em geral, o paciente com câncer é submetido a duas ou mais formas de tratamento a depender do estadiamento da doença e de suas condições clínicas [(2)].

Aproximadamente metade dos pacientes diagnosticados com câncer passará por tratamento com radioterapia, que utiliza feixes de radiação ionizante para levar as células cancerígenas à morte [(3)]. A radioterapia tem como objetivo entregar dose máxima e homogênea a um volume tumoral bem definido e reduzir ao mínimo possível a dose nos tecidos normais adjacentes ao tumor.

Diante dos problemas adversos gerados pelo tratamento de radioterapia e pelo fato de alguns tumores serem sabidamente radioresistentes e, por isso, não responderem ao tratamento com radiação, três frentes de ação têm sido seguidas como suporte ao tratamento do câncer: (i) desenvolvimento de técnicas que não utilizam radiação ionizante, tais como, terapia foto-dinâmica [(4)], terapia foto-térmica [(5,

[6], campos elétricos de tratamento [7], o desenvolvimento de vacinas que estimulam o sistema auto-imune como forma de defesa do organismo [8, 9] e a terapia gênica que tem como propósito a alteração de mecanismos que regulam a expressão de genes sem modificar a sequência do DNA, modulando determinadas funções biológicas de forma transitória para tratar alguma enfermidade; (ii) desenvolvimento de novas drogas cito-protetoras ou radiossensibilizantes para melhorar os resultados do tratamento combinado de radioterapia com quimioterapia [10, 11]; (iii) desenvolvimento de agentes que melhorem a resposta do tecido tumoral ao tratamento isolado de radioterapia [12, 13] ou que proporcionem técnicas multimodais para tratar o câncer.

As doenças associadas ao câncer são causadas por diversas mutações, em diferentes genes, relativos a cada tipo de câncer. Isso implica um desafio para a ciência em compreender a dinâmica molecular que leva a tais anormalidades genéticas, que em alguns casos podem ser estimuladas por vírus, contaminação com produtos químicos derivados da indústria agroalimentar, herança genética, entre outros fatores. Ao longo do tempo, muitos estudos relacionados à epigenética surgiram onde determinados genes podem ser modulados sem alterar estruturalmente a sequência de DNA que os compõe [14, 15]. Isto resultou no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de diversas doenças como neurodegenerativas, neurológicas devido a traumas de alto impacto, oncológicas, transtornos congênitos, entre outras. Na atual pandemia de COVID-19 algumas das vacinas foram desenvolvidas sob a abordagem de terapia gênica em que se reduz à síntese de ácidos nucleicos para a produção de anticorpos que permitem bloquear o mecanismo de internalização do vírus via receptores ACE II [16], por meio da via de vacinas por vetor recombinante [17] ou por meio do mecanismo de mRNA encapsulado [18, 19].

Nesse sentido, a terapia gênica pode ser classificada como *in vivo*, *ex vivo e in situ*. É considerado *ex vivo* quando há retirada de informação celular do paciente, que é modificada para posteriormente ser inoculado com as alterações decorrentes da modulação da expressão do gene alvo do tratamento, como é apresentado no esquema da Figura 1 [20].

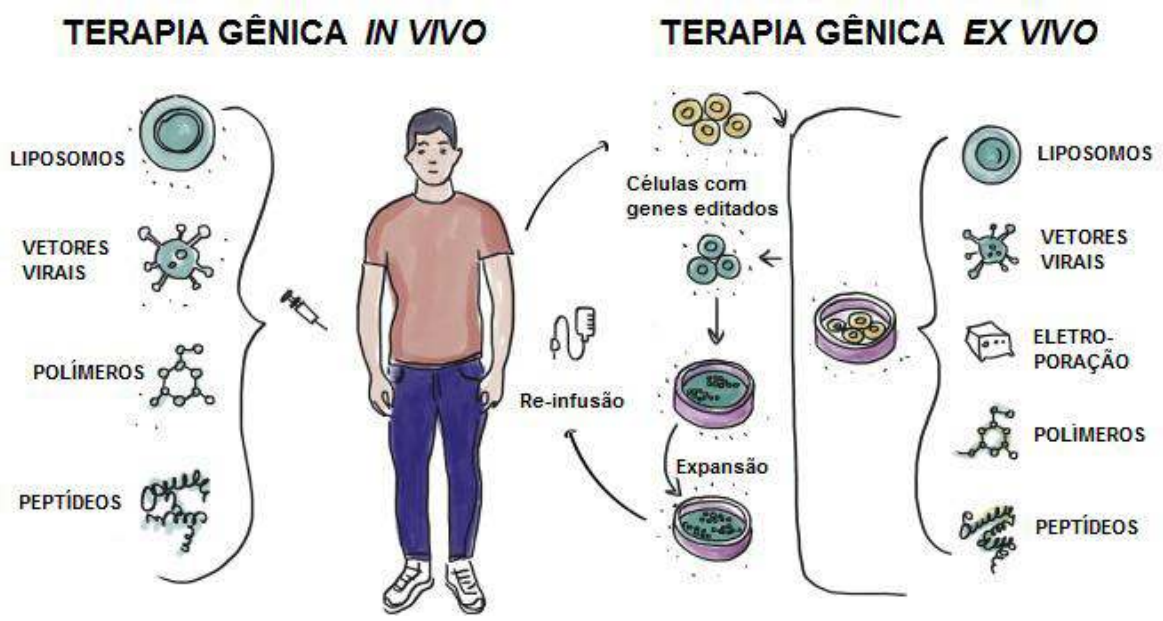


Figura 1. Representação esquemática de terapias gênicas *in vivo* e *ex vivo*.

Fonte: Vaiserman *et al.* [20]

2. NANOPARTÍCULAS DE OURO COMO AGENTE RADIOSENSIBILIZANTE EM TÉCNICAS MULTI MODAIS PARA TRATAR O CÂNCER

Como abordagens terapêuticas tradicionais podem resultar em efeitos adversos graves, e/ou resultados de tratamento insatisfatórios, intensa pesquisa foi deslocada para integrar a nanotecnologia no tratamento do câncer. A nanomedicina, campo sobreposto da nanotecnologia e da medicina, traz uma série de vantagens sobre a terapêutica convencional do câncer, e esses benefícios são possíveis devido às propriedades físicas e químicas únicas das nanopartículas, tais como, tamanho pequeno, composição química, grande área de superfície, forma sob medida e morfologia diferenciada [21].

Nanopartículas de ouro (GNPs, do inglês *gold nanoparticles*) foram um dos primeiros sistemas nanoestruturados utilizados no tratamento do câncer, sendo propostas inicialmente para estudos *in vitro* por Herold em 2000 [22] e, desde então, muita pesquisa tem sido realizada no sentido de medir o fator de crescimento de dose (DEF, do inglês *dose enhancement factor*) local em função da presença de GNPs. A

maioria dos estudos utilizando simulação computacional mostra um DEF entre 10 a 1000 vezes [23, 24]. Resultados promissores têm sido obtidos em medidas *in vitro* [25, 26] e também *in vivo* [27, 28].

É necessária uma terapia local eficaz contra o câncer para evitar progressão de tumores, diminuir o desenvolvimento de metástases sistêmicas e aumentar a possibilidade de erradicar a doença. Em um esforço para isso, agentes radiossensibilizantes são introduzidos para aumentar ainda mais os danos ao tumor, minimizando a toxicidade do tecido normal. São vários os exemplos e pode-se citar a *Cisplatina* e o *Docetaxel* que estão sendo usados atualmente como intensificadores de dose de radiação em radioterapia incluindo estudos sinergéticos com GNPs [11]. O foco será explorar os efeitos da adição destes agentes radiossensibilizantes à plataforma GNP-Radioterapia e testá-los futuramente em ensaios clínicos de fase I [29]. Portanto, uma combinação do uso de agentes radiossensibilizantes, como GNPs, com medicamentos atualmente disponíveis pode ter um impacto significativo no futuro da radioterapia [30]. Para o tratamento do câncer de mama já são relacionadas aproximadamente 21 tipos de nanosistemas diferentes, capazes de se associarem a ligantes químicos tais como anticorpos monoclonais e agentes quimioterapêuticos [31].

Nanopartículas de ouro (GNPs, do inglês *gold nanoparticles*) são partículas de dimensões nanométricas (diâmetro menor do que 200 nm), compostas por átomos de ouro (número atômico Z = 79), e alvo de extensas investigações para potenciais aplicações no tratamento do câncer usando radiação ionizante [32, 33]. Nanopartículas metálicas têm o potencial de aumentar a dose entregue no tumor principalmente devido à maior seção de choque para absorção fotoelétrica em relação ao meio biológico, levando a uma grande geração de elétrons secundários que amplificam significativamente a morte celular. [34] Portanto, marcar o tumor com GNPs traz vantagens terapêuticas na radioterapia conformada, pois há aumento da dose no tumor, podendo-se com isso reduzir as doses prescritas e, consequentemente, os danos ao tecido saudável circundante.

As GNPs são sintetizadas em vários formatos como ilustrado na Figura 2 e fornecem uma plataforma química flexível para incorporação de vários esquemas para localizar a dose no tumor devido à possibilidade de se produzir propriedades funcionais desejáveis. Combinado com os avanços tecnológicos na instrumentação

utilizada para gerar radiação ionizante, a introdução de GNP produz um aumento significativo da dose específica no tumor em comparação com a dose recebida pelo tecido normalmente durante um tratamento por radioterapia.

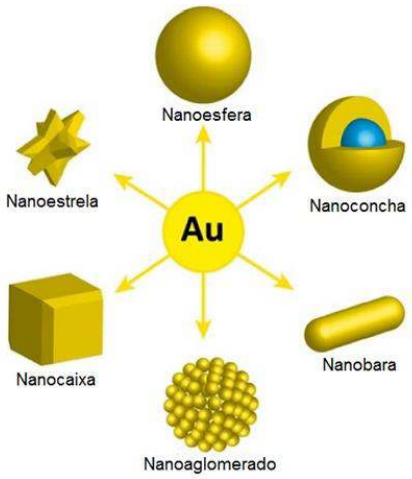


Figura 2. Formatos em que são sintetizadas as nanopartículas de ouro.
Fonte: Gharibkandi *et al*. [34] (adaptado).

3. EPIGENÉTICA E TERAPIAS GÊNICAS

A modulação da expressão gênica vem sendo estudada há quase um século, principalmente em um ramo da biologia conhecido como a biologia do desenvolvimento, que posteriormente levou à abordagem da epigenética como uma maneira de entender se a modulação da expressão é produzida pela exclusividade da programação do código ou existem processos adaptativos nos quais essa programação é contextualizada. Os mecanismos epigenéticos atuam em vários níveis de organização, incluindo regulação direta da função gênica ou modulação da síntese de proteínas específicas, regulação da diferenciação celular pela modificação da transcrição de RNA em proteínas, a regulação de funções e distribuição topográfica dentro de proteínas. Vários modelos, baseados em certas hipóteses, foram propostos [14, 15]. Por exemplo, Waddington (renomado geneticista e embriologista britânico) foi o primeiro a introduzir o termo epigenética e seu chamado modelo de paisagem epigenética considerava a diferenciação celular como uma pirâmide invertida onde a

base da pirâmide é formada por células diferenciáveis com potencial ilimitado sendo essa capacidade restrita como resultado de alterações funcionais nos genes das células. No final da pirâmide, as células perderiam todo esse potencial prospectivo. No entanto, Waddington não foi tão específico na definição da epigenética e finalmente sugeriu que a epigenética está sujeita a "todos aqueles eventos que levam ao desdobramento do programa genético para o desenvolvimento do organismo" [15].

Em 1975, quando os modelos de metilação do DNA foram propostos, não havia evidências experimentais para provar isso. No entanto, o modelo de propagação para a inativação do cromossomo X propôs que a metilação fosse a causa de tal inativação [35, 36].

A biologia do desenvolvimento e a metilação do DNA tornam-se dois elementos condicionantes para a modulação da expressão gênica. A primeira está diretamente associada à hereditariedade e a segunda às limitações para a transcrição gênica [37]. Sob esses critérios é possível afirmar que a diferença entre genética e epigenética se baseia principalmente no fato de que as mudanças produzidas na genética são irreversíveis e regidas pela sequência imposta do DNA durante o desenvolvimento de um organismo e o ambiente não modifica o genótipo, nem a herança adquirida. Enquanto na epigenética, a sinalização e a comunicação celular podem produzir mudanças reversíveis que podem se tornar hereditárias [14, 35, 36, 38]. Em resumo, as alterações epigenéticas podem incluir modificações químicas no DNA ou RNA como a metilação ou também associadas às proteínas constituintes das histonas [39], também a entornos de degradação de mRNA por meio de microRNA, com sequências de cerca de 22 nucleotídeos, assim como a incorporação de variantes de histonas que alteram a conformação da cromatina [38].

Características fisiopatológicas complexas e multifatoriais envolvendo fatores genéticos e adquiridos permitiram o desenvolvimento de terapias gênicas experimentais para o tratamento do glaucoma. Em pelo menos 20 anos, inúmeras plataformas de terapia gênica demonstraram considerável potencial de tradução em ensaios experimentais. Alguns dos estudos se concentram na neuroproteção ou regeneração axônica devido ao glaucoma. O sistema nervoso central de um mamífero adulto tem uma baixa capacidade regenerativa em que a degeneração neuronal é essencialmente irreversível [40]. Os axônios degenerados perdem a capacidade de

transportar o estímulo e, portanto, gradativamente, tanto sua extensão quanto a cobertura ou mielina são fortemente afetadas. Portanto, os neurônios perdem a capacidade de estabelecer sinapses com o alvo. Vários fatores parecem inibir a regeneração do Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo fatores celulares intrínsecos e extrínsecos [40, 41]. Os fatores intrínsecos incluem a ausência ou baixos níveis de certos genes que inibem o crescimento do axônio devido à existência de outros genes no SNC adulto [42]. E os fatores extrínsecos são basicamente governados pela existência de células gliais como astrócitos e oligodendrócitos que atuam como inibidores do crescimento axônico.

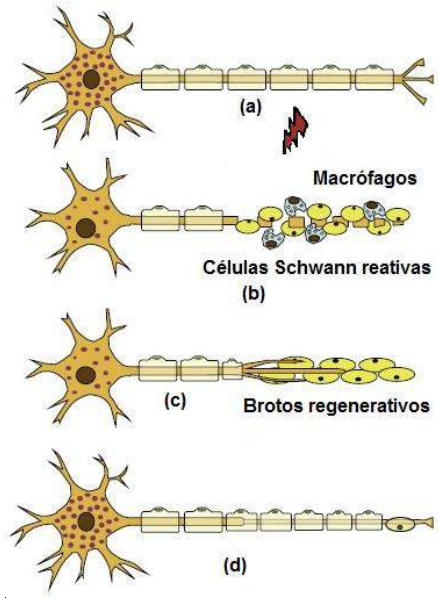


Figura 3. Degeneração e regeneração do dano axônica do nervo periférico.

Fonte: Ramburrun *et al*. [43]

Uma proposta de terapia gênica para o Glaucoma se concentra no uso de um vetor Adeno-Associado recombinante (rAAV) que foi projetado para o tratamento da amaurose congênita de Leber. O medicamento LUXTURNA foi aprovado como um novo tratamento de terapia gênica nos Estados Unidos, União Europeia e Brasil para doenças oculares [40]. A Figura 3 mostra a modulação de um alvo para o qual se destina a regeneração axônica.

4. TERAPIA GÊNICA NO TRATAMENTO DO CÂNCER

A terapia gênica como descrita acima pode ser resumida como a administração de material genômico em um tecido biológico hospedeiro com a finalidade de modificar a expressão de um gene ou alterar as propriedades biológicas das células em um sentido terapêutico. Inicialmente, o principal objetivo das terapias gênicas era tratar doenças genéticas e, aos poucos, foi se reposicionando para o tratamento de distúrbios com diversos padrões, tanto hereditários quanto adquiridos. Por mais de três décadas, o avanço das tecnologias de engenharia genética tem facilitado o uso de terapias gênicas para a prevenção e manejo de algumas doenças intratáveis. Até o momento, mais de 3.000 genes associados a mutações causam doenças e cerca de 2.600 genes são alvo de estudos em testes de terapia gênica para o tratamento de diversos distúrbios [44]. Podemos dividir os vetores de terapia gênica em dois grandes grupos: vetores não virais e vetores virais. Os vetores não virais, por sua vez, são classificados por métodos físicos e químicos. Nos métodos físicos podemos encontrar a transferência gênica por bombardeamento do DNA e eletroporação da membrana celular [45-49]. Nos métodos químicos não virais é frequente o uso de vetores sinergéticos baseados em polímeros catiônicos ou lipídios catiônicos, o que enfraquece as barreiras inibitórias na modulação de expressões de algum gene que limitam as funções e mecanismos celulares [50-53]. Na entrega de vetores baseados em lipídios catiônicos, estão incluídas vesículas extracelulares e lipossomas. O uso de nanopartículas inorgânicas também fazem parte de métodos químicos não virais, como é o caso de sistemas inorgânicos de uma única nanopartícula de ouro, prata ou sistemas nanoestruturados, como óxido de ferro e alguns sais [54]. Os vetores virais usados na terapia gênica são baseados em matrizes de adenovírus associados, adenovírus, lentivírus e mecanismos recentemente conjugados quimicamente para o transporte de mRNA viral encapsulado em lipossomas [55-57].

No caso específico dos tratamentos oncológicos, a morte celular das células malignas torna-se a via mais importante para alcançar, pelo que, a supressão da expressão de genes que modulam a morte celular configura-se como o principal objetivo da terapia gênica [57]. Várias abordagens para a terapia gênica foram desenvolvidas para o tratamento do câncer, incluindo terapia anti-angiogênica, terapia

gênica suicida, imunoterapia, terapia com siRNA, terapia gênica pró-apoptótica, viroterapia oncolítica e terapia gênica enzimática [58]. O uso da Terapia com Células T CAR (Receptor de Antígeno Quimérico - CAR) tem se posicionado com resultados muito promissores com foco na terapia imunogênica. É o caso do Kymriah, aprovado em 2017 pelo FDA dos Estados Unidos (Administração de drogas e alimentos dos Estados Unidos), para o tratamento da leucemia linfoblástica, que utiliza um marcador alvo CD19-específico expressado em células B e tratado com células T CAR conjugada com um vetor lentiviral [59-61]. A administração do medicamento é realizada por procedimento *ex vivo*.

A viroterapia oncolítica baseia-se na competição pela proliferação de células infectadas com vírus oncolíticos que modulam o gene supressor p53 que controla a função apoptótica e que em células malignas atua de forma recombinante ativando a morte das células tumorais. Um exemplo desse tipo de tratamento é o uso do Gendicine, um vetor adenoviral para a modulação do fator p53 para administração *in vivo*, destinado a pacientes com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço aprovado pela Agência Chinesa de Alimentos e Medicamentos em 2003 [62, 63].

Uma das principais complicações derivadas do câncer em estágios avançados e de mau prognóstico são as metástases. Atualmente, um grande número de expressões de microRNA tem sido identificado na base do Cervical Cancer Genome Atlas (TCGA) como potenciais marcadores de linfonodos metastáticos que basicamente deixam um sinal para seu rastreamento [64]. Este fato abre as portas para o desenvolvimento de biomarcadores que caracterizem os mecanismos de evolução das metástases linfonodais neste tipo de câncer e o desenvolvimento de tratamentos clínicos de terapias gênicas alvo [65]. Outros estudos para o efeito antitumoral de metástases cerebrais de tumores primários de mama foram desenvolvidos em um modelo animal com camundongos Sprague-Dawley (SD) de três semanas de idade, nos quais células da linhagem MDA-MB-231Br-Luc foram implantadas intracranianamente, onde o mapeamento metastático foi monitorado por 35 dias. O gene CXCR4 foi amplificado em seus sítios de restrição primários e recombinado com um vetor Lentivirus. O resultado final do tratamento de clonagem realizado em células-tronco mesenquimais (MSC) extraídas de um rim embrionário humano seriam aquelas que finalmente conteriam LV^{CXCR4}. Por meio de técnicas de tratamento de isolamento

e separação, obtêm-se os exossomos que serão utilizados para o estudo antitumoral. Os resultados deste estudo com fator de significância $p<0,05$ mostraram uma melhora do efeito antitumoral no grupo de camundongos tratados com $Exo^{CXCR4\text{-}TRAIL}$ em relação ao grupo controle tratado apenas com exossomos derivados de células-tronco MSC sem recombinação do gene CXCR4 e o lentivírus LV [66].

5. DISCUSSÃO E PERPECTIVAS FUTURAS

O tratamento de doenças trágicas, principalmente o câncer, é um grande desafio e uma boa alternativa se vislumbra no horizonte através do uso de terapias combinadas entre terapias gênicas, quimioterapias, imunoterapia e radioterapia. Uma possível aplicação do uso de fontes radioativas concentra-se no desenvolvimento de radiobiomarcadores que permitem o rastreamento em tempo real da atividade isotópica acoplado ao biomarcador encapsulado em microvesículas ou lipossomas. Isso ajudaria a entender a evolução do câncer em pacientes com baixo prognóstico de vida. Outro aspecto importante revisado nas terapias gênicas concentra-se na possibilidade de estabelecer a reversibilidade da modulação na expressão gênica de uma determinada função celular inibida. No caso da radioterapia, seja por uso externo de fontes emissoras de radiação, seja por inoculação direta de fontes *in situ* e *in vivo* ou sistêmicas de rastreio metabólico, as nanopartículas inorgânicas de alto número atômico tornam-se potenciais fontes secundárias para aumentar o bombardeio do DNA por interação direta, o que aumentaria a morte celular por efeito necrótico ou apoptótico [67].

As barreiras celulares inatas devido ao controle de mecanismos inibitórios na regulação da expressão gênica, podem ser mais suscetíveis à ação de tratamentos quando, ancoradas em nanopartículas ou sistemas nanoestruturados, puderem ser internalizadas mais facilmente, gerando o efeito da eletroporação nas membranas, aumentando o fluxo endógeno nesses tratamentos. Finalizando, o uso de microRNA para bloquear marcadores metastáticos surge como uma proposta promissora para aumentar a expectativa de vida em pacientes com estadiamentos mais avançados. Um efeito permanente ou transitório para o bloqueio das metástases com terapias

gênicas permitiria tentar a inativação da doença por meio de outros tratamentos combinados, alcançando melhores resultados no controle tumoral em pacientes com poucas expectativas de vida.

REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2021. Ca Cancer J Clin. 2021;71(1):7-33.
2. McCune JS. Rapid advances in immunotherapy to treat cancer. Wiley Online Library; 2018. p. 540-4.
3. Oktaria S, Lerch ML, Rosenfeld AB, Tehei M, Corde S. In vitro investigation of the dose-rate effect on the biological effectiveness of megavoltage X-ray radiation doses. Applied Radiation and Isotopes. 2017;128:114-9.
4. Van Straten D, Mashayekhi V, De Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. Cancers. 2017;9(2):19.
5. Mellal I, Oukaira A, Kengene E, Lakhssassi A. Thermal therapy modalities for cancer treatment: A review and future perspectives. Appl Sci Res Rev. 2017;4(02):1-11.
6. Zhang Y, Guo L, Kong F, Duan L, Li H, Fang C, et al. Nanobiotechnology-enabled energy utilization elevation for augmenting minimally-invasive and noninvasive oncology thermal ablation. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2021;13(6):e1733.
7. Mun EJ, Babiker HM, Weinberg U, Kirson ED, Von Hoff DD. Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer TreatmentTumor-Treating Fields in Cancer Treatment. Clinical Cancer Research. 2018;24(2):266-75.
8. Tang L, Zhang A, Zhang Z, Zhao Q, Li J, Mei Y, et al. Multifunctional inorganic nanomaterials for cancer photoimmunotherapy. Cancer Communications. 2022;42(2):141-63.
9. Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Pappa A, Chlichlia K. DNA vaccines to attack cancer: Strategies for improving immunogenicity and efficacy. Pharmacology & therapeutics. 2016;165:32-49.
10. Elias ST, Borges GA, Rêgo DF, Silva OE, Felipe L, Avelino S, et al. Combined paclitaxel, cisplatin and fluorouracil therapy enhances ionizing radiation effects, inhibits migration and induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in oral carcinoma cell lines. Oncology letters. 2015;10(3):1721-7.
11. González-López M, Gutiérrez-Cárdenas E, Sánchez-Cruz C, Hernández-Paz J, Pérez I, Olivares-Trejo J, et al. Reducing the effective dose of cisplatin using gold nanoparticles as carriers. Cancer Nanotechnology. 2020;11(1):1-15.
12. Coleman CN, Lawrence TS, Kirsch DG. Enhancing the efficacy of radiation therapy: premises, promises, and practicality. Journal of Clinical Oncology. 2014;32(26):2832.
13. Sharma A, Goyal AK, Rath G. Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy. Journal of drug targeting. 2018;26(8):617-32.

14. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. Epigenetics. 2006;1(2):76-80.
15. Korochkin L. What is epigenetics. Russian Journal of Genetics. 2006;42(9):958-65.
16. Atlante S, Mongelli A, Barbi V, Martelli F, Farsetti A, Gaetano C. The epigenetic implication in coronavirus infection and therapy. Clinical Epigenetics. 2020;12(1):1-12.
17. Qian Z, Hu Q, Wang F, Sun X, Yin Z. Research and development of adenovirus vectored vaccines. 2020.
18. Bianchi L, Biondi F, Hansel K, Murgia N, Tramontana M, Stingeni L. Skin tests in urticaria/angioedema and flushing to Pfizer-BioNTech SARS-CoV-2 vaccine: limits of intradermal testing. Allergy. 2021.
19. Caballero M, Quirce S. Excipients as potential agents of anaphylaxis in vaccines: analyzing the formulations of currently authorized COVID-19 vaccines. J Investig Allergol Clin Immunol. 2021;31(1):92-3.
20. Vaiserman A, De Falco E, Koliada A, Maslova O, Balistreri CR. Anti-ageing gene therapy: Not so far away? Ageing Research Reviews. 2019;56:100977.
21. Hafeez MN, Celia C, Petrikaite V. Challenges towards targeted drug delivery in cancer nanomedicines. Processes. 2021;9(9):1527.
22. M. Herold ID, CC Stobbe, RV Iyer, JD Chapman, D. Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement. International journal of radiation biology. 2000;76(10):1357-64.
23. Cho SH. Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study. Physics in Medicine & Biology. 2005;50(15):N163.
24. Ngwa W, Makrigiorgos GM, Berbeco RI. Gold nanoparticle-aided brachytherapy with vascular dose painting: Estimation of dose enhancement to the tumor endothelial cell nucleus. Medical physics. 2012;39(1):392-8.
25. Liu W, Chen B, Zheng H, Xing Y, Chen G, Zhou P, et al. Advances of Nanomedicine in Radiotherapy. Pharmaceutics. 2021;13(11):1757.
26. Shukurov I, Mohamed MS, Mizuki T, Palaninathan V, Ukai T, Hanajiri T, et al. Biological Synthesis of Bioactive Gold Nanoparticles from Inonotus obliquus for Dual Chemo-Photothermal Effects against Human Brain Cancer Cells. International journal of molecular sciences. 2022;23(4):2292.
27. Aljohani FS, Hamed MT, Bakr BA, Shahin YH, Abu-Serie MM, Awaad AK, et al. In vivo bio-distribution and acute toxicity evaluation of greenly synthesized ultra-small gold nanoparticles with different biological activities. Scientific reports. 2022;12(1):1-20.
28. Porret E, Le Guével X, Coll J-L. Gold nanoclusters for biomedical applications: toward in vivo studies. Journal of Materials Chemistry B. 2020;8(11):2216-32.
29. Alhussan A, Bozdoğan EPD, Chithrani DB. Combining gold nanoparticles with other radiosensitizing agents for unlocking the full potential of cancer radiotherapy. Pharmaceutics. 2021;13(4):442.
30. Han O, Bromma K, Palmerley N, Bido AT, Monica M, Alhussan A, et al. Nanotechnology Driven Cancer Chemoradiation: Exploiting the Full Potential of Radiotherapy with a Unique Combination of Gold Nanoparticles and Bleomycin. Pharmaceutics. 2022;14(2):233.

31. Nikdouz A, Namarvari N, Shayan RG, Hosseini A. Comprehensive comparison of theranostic nanoparticles in breast cancer. American Journal of Clinical and Experimental Immunology. 2022;11(1):1.
32. Hainfeld JF, Dilmanian FA, Zhong Z, Slatkin DN, Kalef-Ezra JA, Smilowitz HM. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. Physics in Medicine & Biology. 2010;55(11):3045.
33. Păduraru DN, Ion D, Niculescu A-G, Mușat F, Andronic O, Grumezescu AM, et al. Recent Developments in Metallic Nanomaterials for Cancer Therapy, Diagnosing and Imaging Applications. Pharmaceutics. 2022;14(2):435.
34. Gharibkandi NA, Gierałtowska J, Wawrowicz K, Bilewicz A. Nanostructures as radionuclide carriers in auger electron therapy. Materials. 2022;15(3):1143.
35. Doerfler W. DNA methylation—a regulatory signal in eukaryotic gene expression. Journal of General Virology. 1981;57(1):1-20.
36. Doerfler W. DNA methylation and gene activity. Annual review of biochemistry. 1983;52(1):93-124.
37. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nature reviews genetics. 2002;3(6):415-28.
38. Kan RL, Chen J, Sallam T. Crosstalk between epitranscriptomic and epigenetic mechanisms in gene regulation. Trends in Genetics. 2021.
39. Rugo HS, Jacobs I, Sharma S, Scappaticci F, Paul TA, Jensen-Pergakes K, et al. The promise for histone methyltransferase inhibitors for epigenetic therapy in clinical oncology: a narrative review. Advances in therapy. 2020;37(7):3059-82.
40. Lani-Louzada R, Dias MS, Linden R, Ribas VT, Petrs-Silva H. Gene Therapy Strategies for Glaucomatous Neurodegeneration. Current Gene Therapy. 2021;21(5):362-81.
41. Barbosa BG, Cassimiro AVNA, Rocha BGS, Alvarenga BM, Birbrair A, Ribas VT. Pericyte Biology in the Optic Nerve and Retina. Current Tissue Microenvironment Reports. 2022:1-14.
42. Mern DS, Walsen T, Beierfuß A, Thomé C. Animal models of regenerative medicine for biological treatment approaches of degenerative disc diseases. Experimental Biology and Medicine. 2021;246(4):483-512.
43. Ramburrun P, Kumar P, Choonara YE, Bijukumar D, du Toit LC, Pillay V. A review of bioactive release from nerve conduits as a neurotherapeutic strategy for neuronal growth in peripheral nerve injury. BioMed research international. 2014;2014.
44. Belete TM. The current status of gene therapy for the treatment of cancer. Biologics: targets & therapy. 2021;15:67.
45. Du X, Wang J, Zhou Q, Zhang L, Wang S, Zhang Z, et al. Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation. Drug Delivery. 2018;25(1):1516-25.
46. Herrero MJ, Sendra L, Miguel A, Aliño SF. Physical methods of gene delivery. Safety and Efficacy of Gene-Based Therapeutics for Inherited Disorders: Springer; 2017. p. 113-35.
47. Li X, Ruddy B, Taberner A. Characterization of needle-assisted jet injections. Journal of Controlled Release. 2016;243:195-203.

48. Smolders S, Kessels S, Smolders SM-T, Poulhes F, Zelphati O, Sapet C, et al. Magnetofection is superior to other chemical transfection methods in a microglial cell line. Journal of Neuroscience Methods. 2018;293:169-73.
49. Suda T, Liu D. Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. Molecular Therapy. 2007;15(12):2063-9.
50. Darr JA, Zhang J, Makwana NM, Weng X. Continuous hydrothermal synthesis of inorganic nanoparticles: applications and future directions. Chemical reviews. 2017;117(17):11125-238.
51. Riley MK, Vermerris W. Recent advances in nanomaterials for gene delivery—a review. Nanomaterials. 2017;7(5):94.
52. Van Bruggen C, Hexum JK, Tan Z, Dalal RJ, Reineke TM. Nonviral gene delivery with cationic glycopolymers. Accounts of Chemical Research. 2019;52(5):1347-58.
53. Yang R, Chen F, Guo J, Zhou D, Luan S. Recent advances in polymeric biomaterials-based gene delivery for cartilage repair. Bioactive Materials. 2020;5(4):990-1003.
54. Zylberberg C, Gaskill K, Pasley S, Matosevic S. Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy. Gene therapy. 2017;24(8):441-52.
55. Bouard D, Alazard-Dany N, Cosset FL. Viral vectors: from virology to transgene expression. British journal of pharmacology. 2009;157(2):153-65.
56. Goswami R, Subramanian G, Silayeva L, Newkirk I, Doctor D, Chawla K, et al. Gene therapy leaves a vicious cycle. Frontiers in oncology. 2019:297.
57. Ji W, Sun B, Su C. Targeting microRNAs in cancer gene therapy. Genes. 2017;8(1):21.
58. Li T, Kang G, Wang T, Huang H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. Oncology letters. 2018;16(1):687-702.
59. Ali S, Kjeken R, Niederlaender C, Markey G, Saunders TS, Opsata M, et al. The European medicines agency review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the treatment of acute lymphoblastic leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. The oncologist. 2020;25(2):e321-e7.
60. Oluwole OO, Davila ML. At The Bedside: Clinical review of chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for B cell malignancies. Journal of leukocyte biology. 2016;100(6):1265-72.
61. Pettitt D, Arshad Z, Smith J, Stanic T, Holländer G, Brindley D. CAR-T cells: a systematic review and mixed methods analysis of the clinical trial landscape. Molecular Therapy. 2018;26(2):342-53.
62. Xia Y, Li X, Sun W. Applications of recombinant adenovirus-p53 gene therapy for cancers in the clinic in China. Current Gene Therapy. 2020;20(2):127-41.
63. Zhang W-W, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The first approved gene therapy product for cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 years in the clinic. Human gene therapy. 2018;29(2):160-79.
64. Chen S, Gao C, Wu Y, Huang Z. Identification of prognostic miRNA signature and lymph node metastasis-related key genes in cervical cancer. Frontiers in pharmacology. 2020;11:544.
65. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. The Lancet. 2019;393(10167):169-82.

66. Liu M, Hu Y, Chen G. The antitumor effect of gene-engineered exosomes in the treatment of brain metastasis of breast cancer. Frontiers in Oncology. 2020;10:1453.
67. Sun K, Xu Y, Zhang L, Niravath P, Darcourt J, Patel T, et al. A Phase 2 Trial of Enhancing Immune Checkpoint Blockade by Stereotactic Radiation and In Situ Virus Gene Therapy in Metastatic Triple Negative Breast Cancer. Clinical Cancer Research. 2022.