UNIVERSIDADE
FERNANDO
PESSOA

# Nanopartículas como Sistemas de Transporte de RNAs Regulatórios em Terapias para o Cancro Oral: Avanços e Aplicações Clínicas - Uma revisão narrativa [Nanoparticles as Transport Systems for Regulatory RNAs in Oral Cancer Therapies: Advances and Clinical Applications - A Narrative Review]

Dissertação de Mestrado

[Mestrado Integrado em Medicina Dentária]

Eva Emanuela Soares da Silva Barros

Orientador:

Professora Doutora Daniela Martins-Mendes

Coorientador:

Professor Doutor Rúben Fernandes

Junho 2025

# Nanopartículas como Sistemas de Transporte de RNAs Regulatórios em Terapias para o Cancro Oral: Avanços e Aplicações Clínicas - Uma revisão narrativa

[Nanoparticles as Transport Systems for Regulatory RNAs in Oral Cancer Therapies: Advances and Clinical Applications - A Narrative Review]

Dissertação de Mestrado

[Mestrado Integrado em Medicina Dentária]

Eva Emanuela Soares da Silva Barros

Orientador:

Professora Doutora Daniela Martins-Mendes

Coorientador:

Professor Doutor Rúben Fernandes

Junho 2025

“A pressão faz o diamante”, uma frase simples que li algures e guardei para sempre. Nada de valor se constrói sem esforço. Do nada ou do pouco se pode criar valor. O processo é tudo, e é dele que a vida acontece. A minha vida trouxe-me até aqui, e hoje olho para o passado e em persperctiva revejo todas as Evas que fui. A Eva de hoje é mais brilhante que a primeira, mas sinto que ainda tenho capacidade para mais. Três licenciaturas depois, três empregos depois, com marido e um bebé. Seja pela curiosidade, paixão, pelo deslumbre do conhecimento ou pela decisão e determinação. Eu vou continuar no processo. “

# AGRADECIMENTOS

À minha Família que me suportou e apoiou mesmo abdicando da minha presença em tantos momentos, ao longo destes anos.

Aos meus colegas de curso, que fizeram que todos as vindas e horas passadas na faculdade se tornassem momentos bons e de felicidade. Além de ser graças a eles que juntos enfrentamos avaliações e as superamos. Ainda que nunca as tendo conhecido, queria agradecer à Natália e à Erica pelas suas sebentas maravilhosas.

Por fim, mas nunca no final, aos Professores que me guiaram e ajudaram e me fizeram evoluir.

# RESUMO

O carcinoma oral de células escamosas (OSCC) representa a forma mais prevalente de cancro oral, caracterizando-se por elevada agressividade biológica, invasão local precoce, risco de metastização regional e alta taxa de recorrência. O diagnóstico continua frequentemente a ocorrer em fases avançadas da doença, o que condiciona a eficácia terapêutica e contribui para a elevada morbilidade. As abordagens convencionais — cirurgia, quimioterapia e radioterapia — associam-se a efeitos adversos severos e sequelas permanentes, muitas vezes com impacto funcional e estético irreversível. Além disso, a resistência terapêutica, tanto primária como adquirida, limita significativamente a resposta ao tratamento e a sobrevivência global dos pacientes. Neste contexto, as nanomedicinas emergem como uma estratégia inovadora para ultrapassar estas limitações, sobretudo através do uso de nanopartículas projetadas para a entrega dirigida de terapias baseadas em RNA regulatório. Estes RNAs — incluindo microRNAs (miRNA), *small interfering* RNAs (siRNA) e *long non-coding* RNAs (lncRNA) — atuam ao nível pós-transcricional, modulando seletivamente a expressão de oncogenes ou genes supressores tumorais. A sua aplicação terapêutica tem sido dificultada por problemas de estabilidade, imunogenicidade e falta de especificidade, desafios que podem ser eficazmente superados pela associação a nanopartículas inteligentes. As nanopartículas descritas nos estudos analisados incluem estruturas lipídicas, poliméricas, metálicas, híbridas e biológicas (como exossomas), com propriedades adaptadas ao microambiente tumoral. Estas plataformas demonstraram capacidade para aumentar a estabilidade sistémica dos RNAs, promover acumulação seletiva no tumor, e libertação da carga em resposta a estímulos específicos como pH, glutationa ou enzimas tumorais. Diversos estudos *in vivo* revelaram efeitos antitumorais significativos — incluindo redução do volume tumoral, inibição da angiogénese, apoptose tumoral e reversão de resistência a fármacos clássicos como a cisplatina — confirmando o potencial desta abordagem como alternativa terapêutica eficaz e de menor toxicidade para o tratamento do OSCC.



**Palavras chave:** “cancro oral”, “nanomedicina”, “rna regulatório”, “nanopartícula”, “carcinoma de células espinhosas oral”, “silenciamento genético”.

## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most prevalent form of oral cancer, characterized by high biological aggressiveness, early local invasion, regional lymph node metastasis, and a high recurrence rate. Diagnosis often occurs at advanced stages, limiting therapeutic efficacy and contributing to substantial morbidity. Conventional treatment strategies — surgery, chemotherapy, and radiotherapy — are associated with severe side effects and frequently result in permanent functional and aesthetic sequelae. Furthermore, both intrinsic and acquired therapeutic resistance significantly compromise treatment response and overall patient survival. In this scenario, nanomedicine has emerged as a promising strategy to overcome these limitations, particularly through the use of nanoparticles designed for the targeted delivery of regulatory RNA-based therapies. These RNAs — including microRNAs (miRNAs), small interfering RNAs (siRNAs), and long non-coding RNAs (lncRNAs) — act at the post-transcriptional level, selectively modulating oncogene or tumor suppressor gene expression. However, their therapeutic application is challenged by issues related to instability, immunogenicity, and lack of specificity — hurdles that can be effectively addressed by encapsulation within intelligent nanoparticle platforms. The nanoparticles described in the reviewed studies include lipid-based, polymeric, metallic, hybrid, and biologically-derived systems (such as exosomes), engineered with features adapted to the tumor microenvironment. These nanocarriers have demonstrated the ability to enhance the systemic stability of regulatory RNAs, promote tumor-selective accumulation, and trigger controlled release in response to specific stimuli such as pH, glutathione, or tumor-associated enzymes. Multiple in vivo studies have shown marked antitumor effects — including tumor volume reduction, inhibition of angiogenesis, induction of apoptosis, and reversal of resistance to conventional drugs such as cisplatin — reinforcing the potential of this strategy as an effective and less toxic alternative for OSCC treatment.



**Keywords:** “oral cancer”, “nanomedicine”, “regulatory rna”, “nanoparticle”, “squamous cell carcinoma”, “gene silencing”.

# ÍNDICE GERAL

**I. INTRODUÇÃO ..... 1**

**II. METODOLOGIA ..... 3**

1. Desenho do estudo 3
2. Fontes de informação e estratégia de investigação 3
3. Seleção dos artigos e critérios de elegibilidade 5
4. Risco de viés (avaliação crítica metodológica) 5
5. Resultados 6

**III. REVISÃO DA LITERATURA ..... 9**

1. Nanopartículas Inorgânicas 13
2. Nanopartículas Lipídicas 18
3. Nanopartículas Poliméricas 21
4. Nanopartículas Peptídicas 29
5. Exossomas e Vesículas extracelulares e estruturas de DNA 31

**V. DISCUSSÃO ..... 37**

1. Comparativo entre categorias de nanopartículas 37
2. Vantagens sobre terapias convencionais 38
3. Limitações pré-clínicas observadas 40
4. Barreiras à translação clínica 41
5. Sugestões para investigação futura 41
6. Exossomas, vesículas extracelulares, péptidos e estruturas de DNA como nanopartículas 43

**VI. CONCLUSÃO ..... 45**

**VII. BIBLIOGRAFIA ..... 47**

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1:** Diagrama de fluxo PRISMA com a informação sobre as diferentes fases da seleção dos artigos ..... 8

# ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1:** Modelo PICO para a formulação da questão clínica. ..... 3

**Tabela 2**: Critérios de inclusão e exclusão ..... 4

**Tabela 3:** Avaliação crítica metedológica para revisões sistemáticas e sínteses de investigação. ..... 6

**Tabela 4:** Resultados obtidos nas diferentes bases de dados. ..... 7

**Tabela 5:** Resumo dos artigos selecionados organizado por autor, estratégia, classe NP, RNA e alvo. ..... 10

# LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS OU ACRÓNIMOS

ADN – ácido desoxirribonucleico

AA - anisamida

CD44 - *Cluster of Differentiation 44* (receptor celular)

CCEO – carcinoma de. células espinhosas orais

CCE - carcinoma de células. espinhosas

CPP – sequência catiómica de penetração celular

CS – chitosan – quitosano

DDS – *drug delivery system* – sistema de entrega direcionada

DMP - micela lipídica catiónica

DOPA – lípido 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato

DOTAP – lípido 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano

DOX - doxiciclina

EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor* - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

EMT – *Epithelial mesenquimatous transition* -Transição epitélio mesenquimatosa

EPR - *Enhanced Permeability and Retention* (efeito)

FA - *folic acid* - ácido fólico

GO – *graphene oxide* – óxido de grafeno

GSH – Glutationa reduzida

hBMSC – *Human bone marrow stem cells* – CEMOh – células estaminais da medúla óssea humana

HNSSC – *Head and neck squamous cell carcinoma – Carcinoma das células espinhosas da cabeça e pescoço*

HSR - *Heat shock. Response*- resposta ao choque de calor

*LCP – lipid calcium phosphate* – Lípido fosfato cálcio

MDR1 - *Multidrug Resistance Protein* 1 – complexo de multirresistência a farmácos

miRNA – microRNA

NMOF – *nano metal organic framework* - estrutura orgânica nano metálica

NP – Nanopartícula

NTA - *Nanoparticle tracking analysis* – sistema de análise de nanopartículas

CCEO - *Oral Squamous Cell Carcinoma* – Carcinoma das células epinhosas

PAMAM – Polímero de poli-amidamina

PBAE – Polímero Poli-β-amino éster

PBS - *Phosphate Buffered Saline* – Tampão de fosfato salino

PBAE - Poli-β-amino éster

PCR - *Polimerase chain reaction* – reacção de polimerase em cadeia

PCL - Poli ε-caprolactona

TFD – terapia fotodinâmica

PDX - *Patient-derived xenograft* – xenotransplante ortotópico derivado de paciente

PEG – Polímero polietilenoglicol

PEI – Polímero polietilenimina

PGA – Polímero ácido poliglicólico

PLGA - Polímero doo ácido lactopoliglicólico

PS – *photosensitizing therapy agente* – agente fotossensibilizante

PS – Sulfato de protamina

Pyro PA - *pyropheophorbide phosphatydic acid*

RGD - Sequência de péptido arginina-glicina-ácido aspártico

RNA - *Ribonucleic Acid – Ácido ribonucleico*

ROS - Radical oxygen species. – ERO - espécies radicais de oxigénio

SAS – linhagem celular cancro língua

SHED – *Stem cells of deciduous exfoliated teeth* – células estaminais de dentes decíduos exfoliados

SCC4 – linhagem celular cancro epitelial língua

siRNA - *small interfering RNA- pequeno RNA de interferência*

TME - *Tumor Microenvironment* – Microambiente tumoral

TFT – terapia fototérmica

VEGF-A - *Vascular Endothelial Growth Factor A*

# I. INTRODUÇÃO

O carcinoma oral de células escamosas (OSCC) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral e continua a apresentar elevados índices de recorrência e um prognóstico reservado, mesmo com os avanços nas modalidades terapêuticas convencionais (Wang et al., 2023). A sua elevada agressividade e o diagnóstico frequentemente tardio contribuem para a elevada taxa de mortalidade, associando-se frequentemente a metástases e a sequelas funcionais irreversíveis resultantes de tratamentos mutilantes (Chaturvedi et al., 2013 como citado em Xie et al., 2022). Estes tratamentos incluem cirurgia extensiva, radioterapia e quimioterapia baseada em cisplatina, que, embora eficazes em alguns casos, estão frequentemente associados à resistência tumoral adquirida e a efeitos adversos significativos (Wang et al., 2023; Xie et al., 2022).

Perante estes desafios, as terapias baseadas em RNA regulatório, como microRNAs (miRNAs) e small interfering RNAs (siRNAs), têm emergido como abordagens promissoras para silenciar genes oncogénicos de forma seletiva. O conceito de interferência por RNA (RNAi), inicialmente descrito por Fire em 1998 (citado por Wang et al., 2023), revolucionou a biologia molecular e abriu novas possibilidades para o desenvolvimento de terapias altamente específicas. Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas de RNA não codificante que regulam a expressão génica ao nível pós-transcricional, estando a sua desregulação frequentemente associada à progressão tumoral, metástase e resistência a fármacos (Calin & Croce, 2006; Bartel, 2009; Gombos et al., 2013; He et al., 2015 como citado em Ou et al., 2019). Os siRNAs, por sua vez, permitem silenciar diretamente a expressão de genes-alvo, representando uma estratégia de elevada especificidade terapêutica (Dorsett & Tuschl, 2004 e Castanotto & Rossi, 2009; como citado por Xie et al., 2022).

Contudo, a eficácia clínica destas abordagens depende de um sistema de entrega seguro e eficiente, capaz de proteger os RNA do ambiente extracelular, promover a sua acumulação seletiva no tumor e libertação intracelular (Kanasty et al., 2013 e Whitehead et al., 2009; como citado por Xie et al., 2022). É neste contexto que surgem as NP como plataformas tecnológicas de destaque no campo da nanomedicina. Estas estruturas, com dimensões na escala nanométrica, oferecem características favoráveis como elevada capacidade de encapsulamento, modificabilidade da superfície, e capacidade de resposta a estímulos específicos do microambiente tumoral (Ou et al., 2019; Liu et al., 2012). Em particular, os exossomas, vesículas extracelulares de origem endógena, demonstram elevada biocompatibilidade e

estabilidade sistémica, aliando-se a uma capacidade de direcionamento tumoral inata (Kalluri & LeBleu, 2020; Vader et al., 2016; como citado por Wang et al., 2023).

Assim, a combinação de RNA regulatório com nanopartículas representa uma estratégia integrada com elevado potencial terapêutico no OSCC. Esta abordagem visa não apenas aumentar a eficácia terapêutica, mas também reduzir os efeitos adversos e ultrapassar os mecanismos de resistência associados às terapias convencionais. O presente trabalho foca-se na análise sistemática dos avanços mais recentes nesta interseção terapêutica, com base em estudos *in vivo*, discutindo as suas aplicações, vantagens, limitações e perspectivas para a translação clínica.

Apesar dos avanços promissores observados em estudos pré-clínicos com NP funcionalizadas para entrega de RNA regulatório no tratamento do CCEO, a sua aplicação clínica permanece limitada. Até à data, não existem ensaios clínicos concluídos especificamente direcionados à utilização de NP contendo miRNA ou siRNA no tratamento do carcinoma oral, o que evidencia uma lacuna importante na translação destes resultados para a prática médica. Esta ausência reforça a necessidade urgente de estudos translacionais e clínicos robustos que validem a segurança, a eficácia e a viabilidade destas terapias em humanos. A consolidação deste campo dependerá, inevitavelmente, do fortalecimento da colaboração entre investigadores, clínicos e a indústria farmacêutica, bem como do desenvolvimento de plataformas tecnologicamente otimizadas para uso clínico.

# II. METODOLOGIA

## 1. Desenho do estudo

O presente trabalho segue uma metodologia de revisão narrativa. A questão clínica formulada para a prossecução desta revisão foi baseada na estratégia PICO (*Population, Intervention, Comparison, Outcome*) utilizada nas *guidelines* de elaboração de revisões sistemáticas, para definir a pergunta de investigação (Tabela 1).

**Tabela 1:**

*Modelo PICO para a formulação da questão clínica.*

| | |
|---|---|
| **População/Problema** | Pacientes com Cancro Oral |
| **Intervenção** | Sistemas com nanopartículas para entrega de RNA regulatórios (siRNA e miRNA) |
| **Comparação** | Sistemas de entrega de fármacos convencionais ou outras terapias de RNA |
| **Outcome** | Eficácia melhorada, efeitos adversos reduzidos ou silenciamento de genes direcionado |

## 2. Fontes de informação e estratégia de investigação

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica no período janeiro 2024 até abril 2025, nas bases de dados *Pubmed, Google Scholar, Science Direct e Web of Knowledge.* Foram utilizadas diversas combinações de palavras-chave e *MeSH terms* com os marcadores boleanos "*AND*" e "*OR*": *"cancer", "clinical outcome", "delivery", "delivery system,"exosome", "gene", "gene silencing" (MeSH), "post transcriptional" (MeSH,), "invivo", "liposome", "micelle", "mir", "mirna" (MeSH), "model", "mouth, neoplasm", "nanocarrier", "nanoconjugate", "nanocomplex","nanomedicine" (MeSH), "nanoparticle", "nanoparticles", "nanotechnology", "oral cancer" (MeSH), "oral carcinoma", "oral squamous cell carcinoma", "CCEO", "regulatory rna", "rna", "rna delivery", "si", "silencing", "sirna" (MeSH), "sirna delivery", "therapeutic", "therapy", "treatment".* Nos filtros usados na pesquisa foram selecionados o limite temporal de 2015-2025 e o idioma em inglês.

Para a escolha dos artigos foram aplicados critérios de inclusão e exclusão representados na tabela 2.

**Tabela 2**:

*Critérios de inclusão e exclusão*

| Critérios de Inclusão | Critérios de Esclusão |
|---|---|
| **Tipo de estudo** | |
| Estudos pré-clínicos (*in vivo*) que avaliam a eficácia das NP para a entrega de RNAs regulatórios (siRNA/miRNA) no tratamento do cancro oral e da língua<br>Ensaios clínicos envolvendo terapias baseadas em RNA utilizando nanopartículas no cancro oral<br>Revisões sistemáticas ou meta-análises com foco em sistemas de entrega de RNA baseados em nanopartículas para o cancro | Investigação não relacionada com nanopartículas ou sistemas de entrega de RNA<br>Estudos focados noutros tipos de cancro para além do cancro oral (por exemplo, cancro do pulmão, da mama ou colorretal)<br>Artigos não originais, como comentários, editoriais ou artigos de opinião |
| **População** | |
| Estudos com foco específico no cancro oral<br>Investigação envolvendo pacientes ou modelos de cancro oral | Estudos envolvendo tratamentos gerais oncológicos sem foco específico no cancro oral<br>Investigação em populações saudáveis ou modelos de doenças não relacionadas |
| **Intervenção** | |
| Utilização de nanopartículas, lipossomas, transportadores poliméricos ou outras plataformas de nanotecnologia (endossomos, exossomas, tfNAs…) para administração de siRNA ou miRNA<br>Estudos que exploram a terapia dirigida, o silenciamento genético ou os mecanismos anticancerígenos mediados pela administração de RNA | Terapias que não envolvem a administração de siRNA, miRNA ou RNA regulador<br>Estudos utilizando sistemas de entrega não baseados em nanopartículas |
| **Resultados** | |
| Eficácia terapêutica (redução do tamanho do tumor, taxas de sobrevivência, inibição da via molecular)<br>Perfis de segurança, incluindo efeitos secundários ou toxicidade reduzidos | Estudos sem resultados terapêuticos claros (por exemplo, estudos moleculares sem implicações clínicas ou pré-clínicas)<br>Investigação focada apenas em modelos teóricos ou computacionais sem validação experimental |

3. Seleção dos artigos e critérios de elegibilidade

Uma avaliação preliminar dos títulos e resumos dos artigos foi realizada para determinar quais artigos atendiam aos objetivos do estudo, e os artigos irrelevantes e duplicados foram removidos. Todos os artigos que se encontravam completos foram lidos na íntegra após a fase de identificação inicial, a fim de verificar a elegibilidade. Esta revisão foi constituída por 28 artigos.

4. Risco de viés (avaliação crítica metodológica)

Foi realizada uma avaliação crítica da qualidade metodológica de todos os artigos incluídos, utilizando ferramentas elaboradas pelo Joanna Briggs Institute: "*The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews.*" para revisões sistemáticas, (Whiting et al., 2003).

Os resultados desta avaliação foram usados para transmitir a síntese e interpretação dos resultados do estudo. Para avaliação das evidências da investigação foi preenchido o formulário com as ferramentas de avaliação crítica do Joanna Briggs Instituite (JBI) (Moola et al., 2019).

As ferramentas são constituídas, por 11, parâmetros de avaliação, que levam os examinadores a percorrer a totalidade dos artigos, com o objetivo de preencher cada um dos parâmetros com "*Yes*", nos casos em que o artigo possua a totalidade da informação em avaliação; "*No*", quando o artigo não possui qualquer referência à informação em avaliação, "*Unclear*", em casos nos quais a informação em avaliação está apenas mencionada de forma parcial, "*Not aplicable*" quando o parâmetro não é passível de ser aplicado ao artigo em avaliação por determinantes metodológicas.

O instrumento ou ferramenta utilizada para avaliar o risco de viés, rigor ou qualidade deste estudo foi a leitura por um segundo revisor da equipa de investigação.

**Tabela 3:**

*Avaliação crítica metedológica para revisões sistemáticas e sínteses de investigação.*

| | Yes | No | Unclear | Not applicable |
|---|---|---|---|---|
| **Is the review question clearly and explicitly stated?** | □ | □ | □ | □ |
| **Were the inclusion criteria appropriate for the review question?** | □ | □ | □ | □ |
| **Was the search strategy appropriate?** | □ | □ | □ | □ |
| **Were the sources and resources used to search for studies adequate?** | □ | □ | □ | □ |
| **Were the criteria for appraising studies appropriate?** | □ | □ | □ | □ |
| **Was critical appraisal conducted by two or more reviewers independently?** | □ | □ | □ | □ |
| **Were there methods to minimize errors in data extraction?** | □ | □ | □ | □ |
| **Were the methods used to combine studies appropriate?** | □ | □ | □ | □ |
| **Was the likelihood of publication bias assessed?** | □ | □ | □ | □ |
| **Were recommendations for policy and/or practice supported by the reported data?** | □ | □ | □ | □ |
| **Were the specific directives for new research appropriate?** | □ | □ | □ | □ |

## 5. Resultados

No levantamento bibliográfico preliminar nas bases de dados eletrónicas obtiveram-se 28 artigos. A estratégia da pesquisa utilizou diversas combinações com a finalidade de alcançar o maior número de artigos. Esta é apresentada em termos genéricos é apresentada na tabela 4.

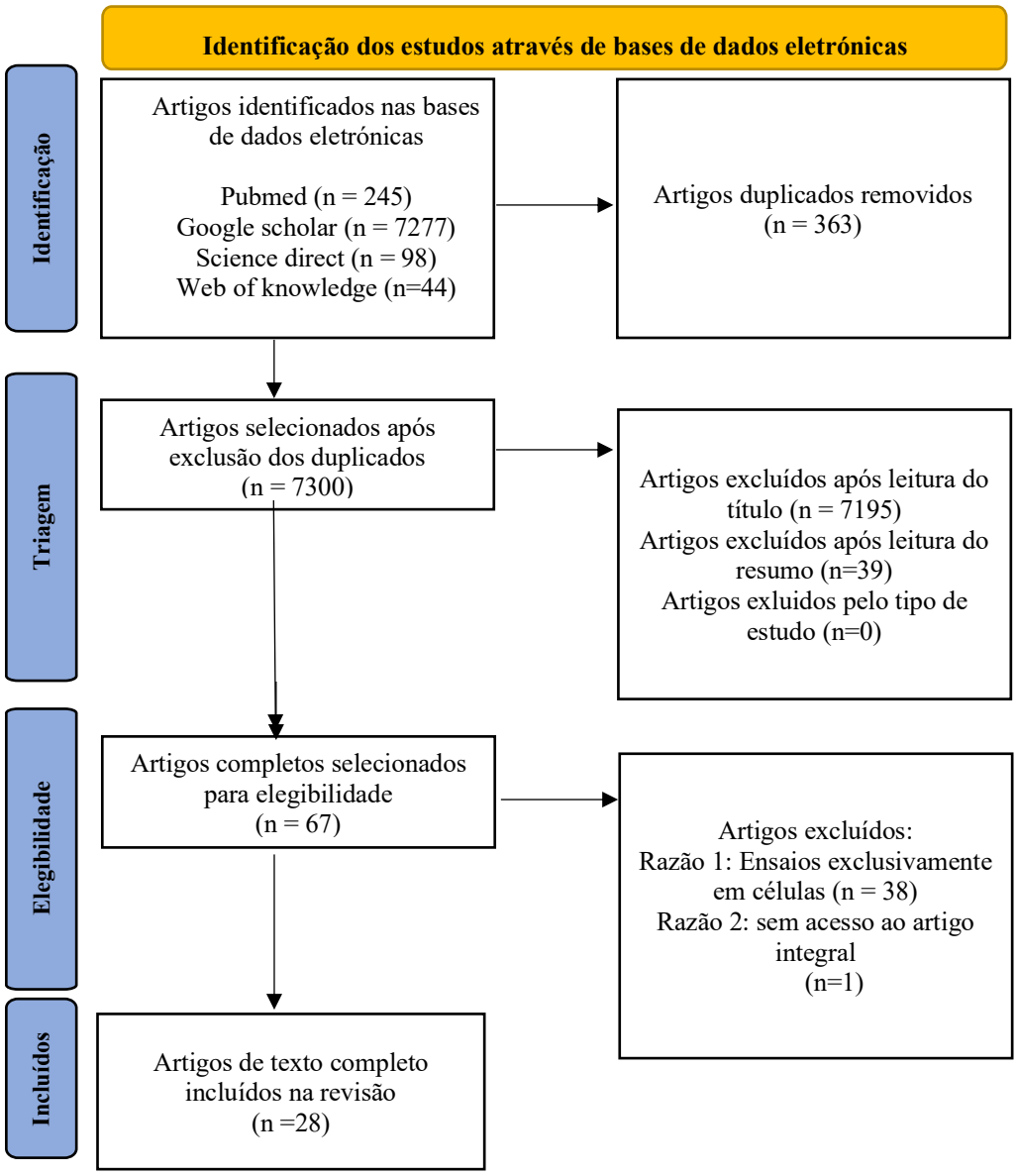
**Tabela 4:**

*Resultados obtidos nas diferentes bases de dados.*

| Base de dados | Termos de pesquisa | Resultados |
|---|---|---|
| **PubMed** | *Cancer, clinical outcome, delivery, delivery system, exosome, gene, gene silencing, gene silencing, post transcriptional, hCCEO, liposome, micelle, Mir, mirna, model, mouth neoplasm, nanocarrier, nanocarriers, nanocomplex, nanomedicine, nanoparticle, nanoparticles, nanotechnology, oral cancer, oral carcinoma, oral squamous cell carcinoma, CCEO, regulatory rna, rna, rna delivery, si, silencing, siRNA, sirna delivery, therapeutic, therapy, treatment* | 19 |
| **Google Scholar** | | 7 |
| **Science direct** | | 0 |
| **Web of Knowledge** | | 2 |

As instruções do PRISMA foram seguidas ao longo do processo de seleção dos artigos. Após a remoção dos artigos duplicados (363), ficou-se com 7277 artigos. Foram excluídos 7195 artigos após leitura dos títulos, 39 após leitura do resumo, tendo sido eliminados 7233 artigos. Então selecionaram-se 30 artigos para a leitura completa e aplicação dos critérios de elegibilidade escolhidos. No final verificou-se um total de 28 artigos (Figura 1).

**Figura 1:** *Diagrama de fluxo PRISMA com a informação sobre as diferentes fases da seleção dos artigos.*




.

# III. REVISÃO DA LITERATURA

Foram selecionados 28 artigos de acordo com os critérios estabelecidos na metodologia. À data da investigação, não foi encontrada nenhuma aplicação clínica, nem ensaios clínicos relativos a nanomedicinas de RNA regulatório para CCEO.

Uma vez que a classificação de cancro oral na investigação por vezes excluía ensaios pertinentes por estes estarem englobados em "cancro da cabeça e pescoço", foram adotados diversos "queries" no sentido de alcançar um maior número de estudos. Da mesma forma, encontrou-se alguma dificuldade na separação da classificação entre "cancro oral" e "cancro da língua". Como tal, optou-se por se incluir "cancro da língua" como sendo "cancro oral". Assim, consideramos elegíveis os estudos com base em tumores de linhas celulares "cancro oral" e "cancro da língua". Esta situação remete para a chamada de atenção à necessidade de adaptação universal de designação nos títulos e abstracts de artigos, da correta designação do tipo de cancro em análise.

De forma a organizar a informação reunida, foi elaborada uma tabela resumo a partir dos artigos selcionados (tabela 5). Para encontrar um seguimento lógico na narrativa deste trabalho serão descritos os estudos agrupados em grupos de NP e em ordem cronológica

**Tabela 5:**

*Resumo dos artigos selecionados organizado por autor, estratégia, classe NP, RNA e alvo.*

| Autor/Ano | Estudo | Classe NP | RNA | *Silencing* | População | Comparação | *Outcome* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **(Alexander-Bryant et al., 2015)** | Endossoma + péptido quimera | Péptido | siCIP2A | Fosfatase 2A(↓EGFR) | Camundongos xenotransplantados CCEO (linha CAL-27) | Dox isolada | ⇩⇩ tumoral, apoptose, e superação resistência |
| **(Alexander-Bryant et al., 2017)** | Dual péptido | Complexo Péptido | siCIP2A | Fosfatase 2ªA(↓EGFR) | modelo xenotransplante ortotópico CCEO | siCIP2A isolada | ⇧acumulação siRNAs tecidos tumorais |
| **(Chen et al., 2015)** | LCP - AA | Híbrida Lípido-polím | siHIFα | HIF1α | camudongo xenotransplantado SCC4 e SAS | PDT isolada | ⇧regressão do tamanho tumor |
| **(Ding et al., 2024)** | CaCO3/PS/DNA coprecipitados | Inorgânica | miR-200c | Promover regeneração óssea e inibir a inflamação reabsortiva | modelo xenotransplante ortotópico (ratinho) CCEO | pDNA miR-200cc com PS | ⇩ tamanho tumores pós tratamento local e ferramenta adjuvante reconstrução cirurgica |
| **(Huang et al., 2023)** | Redox sensitiva | Polímero | siLCN2 | Metástases e EGFR resistência | Camudongo xenotransplante de Cal27 e PDX | siLCN2 isolado | ⇩expressão de LCN2 ×crescimento e metastização |
| **(Kase et al., 2021)** | Derivados fibroblastos modificados | Exossoma | siLCP1 | Supressão LCP1 | modelo murino xenotransplantado SAS ou HSC-3 | Exossoma não modificado | ⇩⇩ volume tumoral |
| **(Lecaros et al., 2016)** | LCP | Híbrida lípido-polím | siVEGF-A | Angiogénese | camudongo xenotransplantados CCECP | PDT isolada | ⇩⇩ tamanho tumoral |
| **(Li et al., 2019)** | Vesícula EC derivada T cel γδ | Vesículas extracelulares | miR-138 | Supressor tumoral | Camudongos xenotransplantados CCEO | TFD isolada | ⇩⇩ tamanho tumoral ⇧infiltração linfócitos T |
| **(Li et al., 2024)** | pH responsivo | Polímero | miR-411-5p | via de sinalização do PI3K/Akt - miR-411-5p | camudongo xenotransplante ortotópico sobrexpressão vector circ- OCAC | cirOCAC isolado | ⇩ massa e volume tumoral ⇩ potencial de metastização |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **(Liu et al., 2022)** | Exossomas de SC decíduos esfoliados | Exossoma | miR100-5p<br>miR-1246 | Angiogénese endotelial | modelo murino de esponja subcutânea | | ⇧efeito antiangiogénico |
| **(Lo et al., 2022)** | pH responsiva combinatorial | Polímero<br>Híbrido | miR-320 +<br>oxaliplatina | Sensibilizar para receber a oxaliplatina | modelo xenotransplante ortotópico animal | oxaliplatina | ⇩ ⇩ tamanho e supressão tumoral e parâmteros efeitos adversos, |
| **(Lu et al., 2024)** | Responsivo redução | Polímero | siOCMRL1 | EMT supressão | Camudongo xenotransplante de HSC6 e PDX | siOCMRL1 isolado | ××proliferação, invasão e migração<br>⇩ volume tumoral<br>⇩metastização linfática |
| **(Ma et al., 2024)** | Dual siRNA auto montada micela DMP | Lípido Híbrido | siSTAT3 +<br>siTGF-β | Proliferação e invasão óssea | modelos ortotópicos de CCEO | siSTAT3 isolado | Inibição do crescimento tumoral e ⇩ ⇩ reabsorção óssea mandibular |
| **(Ou et al., 2020;** | Óxido grafeno | Inorgânica<br>Híbrida | miR-214 | Progressão crescimento tumor | Camundongos xenotransplantados CCEO | miR-214 isolado | ⇩⇩volume tumoral, apoptose (>entrega) |
| **(Sayyed et al., 2021)** | Exossomas de células sens/res | Exossoma | miR-155 | Reverter resistência cisplatina | xenotransplantes em camundongos | cisplatina | restauro sensibilidade à cisplatina<br>⇩ volume tumoral |
| **(Shi et al., 2020)** | Biomimética encapsulada membrana tumor autóloga | Polímero | siNrf2 | Factor transcrição regulado redox (resistência TFD) Nrf2 | Camudongos xenotransplantados CCEL | TFD isolada | ×× proliferação apoptose células<br>××crescimento tumoral e angiogénese |
| **(Wang et al., 2016)** | GNR | Metal | siBAG3 | Choque resposta ao calor | camundongos BALB/c xenotransplantados CCEO (linha CAL-27) | FTT tumoral | sensibiliza à PTT com ⇩termoresistencia e ⇩dose radiação |
| **(Wang et al., 2018)** | Sílica Mesoporosa | Inorgânica<br>Híbrida | siMDR1 | MDR1 P-glicoproteína 1 | Camudoongos xenotransplantados CCEO (linha CAL-27) | Dox isolada | ⇩⇩ tumoral maior e ⇩resistência |
| **(Wang et al., 2021)** | Quitosano ALA | Polímero | shGBAS | Expressão determinante malignidade GBAS | Camudongos xenotransplantados WSU-HN6 | TFD isolada | volumes do tumor ⇩⇩ baixos |
| **(Wang et al., 2021)** | Quitosano TPP | Polímero | shMTHFD1L | Citoquina associada tumor | Camudongo xenotransplantado com cal27 | | ⇩⇩ significativa tamanho tumoral |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **(Xie et al., 2019)** | Derivados medula óssea | Exossoma | miR-101-3p | EZH2 | camundongos xenotransplantados CCEO (SCC-9) | miR-101-3p isolado | ⇩ significativa do volume tumoral |
| **Yeh et al., 2021)** | | Lípido Híbrida | siEGFR | Expressão EGFR | Camudongo de xenotransplantados SCC4 e SAS | siRNA ou TFD isolado | ⇩ significativa volume tumoral |
| **(Xu et al., 2024)** | Nanoprata agente terapêutico vantajoso DDS | Metal | miR-181a-5p | Reduzida malignidade | modelo murino com tumores derivados de CCEO | miR-181a-5p isolado | ⇩⇩volume tumoral, apoptose, proliferação |
| **(Xu et al., 2024)** | miR-149 em estrutura protecção e estável de 4 cadeias simples ADN | tFNA | miR-149 | inibir via oncogénica Pi3k/Akt | modelo murino xenotransplantado Cal27 | miR-149 isolado | ⇩ volume tumoral, ⇧apoptose |
| **(Yang et al., 2024)** | pH responsiva | Polímero | miR-let-7b | MOR (metástases) | xenotransplante metástases Cal27 | miR-let7b não encapsulado | ⇩ número e tamanho metástases<br>⇩ expressão marcadores dproliferação |
| **(Yang et al., 2024)** | pH responsiva com péptido direcionador | Polímero | lncZEB1-AS1 | ZEB1-AS1 | Modelo camudongo de metastização pulmonar Cal27 | cisplatina | ⇩ Resistência cisplatina |
| **(Zhou et al., 2022)** | Inductive hipóxia imunoterapia e prevenção | Metal | siHIFα | Hipóxia | modelo PDX em rato modelo de CCEO induzida por 4NQO | TFD isolada | ⇩microambientehipóxico<br>⇧respostas imunitárias antitumorais |

Legenda: Aumento (⇧), diminuição (⇩), diminuição acentuada (⇩⇩), Inibição (××).

1. Nanopartículas Inorgânicas

No ensaio conduzido por Ding et al., 2024 foi sintetizada uma NP com uma proporção de CaCO3 e PS para transporte e entrega de pDNA miR-200c co-precipitado pelo sulfato de protamina (SP). O CaCO3 é um biomaterial mineral com excelente osteocondutividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade na formação de osso. O SP é um antídoto clínico para anticoagulação pela heparina e foi previamente reportado como tendo aumentado a eficiência de transfecção de pDNA miR-200c e pela melhoria da formação de osso alveolar em locais em defeito como citado em Remy et al., 2022. O miR-200c é um microRNA subregulado, com papel antitumoral em vários cancros, incluindo CCEO. O seu *knockdown*, suprime a invasão celular e migração tumoral. O nanosistema CaCO3 com PS aumentou a transfecção de pDNA miR-200c, assim como a expressão de miR-200c no modelo xenotransplante ortotópico camudongo. Foi verificada diminuição do tamanho dos tumores pós tratamento localizado. Foi determinada a proporção ideal de CaCO3/PS para maior eficiência de transfecção, sendo este um parâmetro essencial de ajuste. Pensa-se que está relacionado com alterações eléctricas da NP. Assim, sugere-se mais estudos sobre este parâmetro além do PS, mas também para investigação da influência da resposta imune e dinâmica do microambiente tumoral em resposta à sobrexpressão de miR-200c, que em modelos animais *in vivo* não permitem simular. Além da sua capacidade de promoção da regeneração óssea e inibição da inflamação associada, miR-200c pode servir como ferramenta adjuvante administração local na reconstrução cirúrgica de pacientes com avançados estágios CCEO para promover a cura do osso e diminuir a recorrência tumoral.

O estudo conduzido por Xu et al. (2024) propôs uma abordagem terapêutica inovadora para o CCEO, combinando a acção do miR-181a-5p com NP de prata (AgNPs), explorando esta sinergia como uma alternativa eficaz ao tratamento convencional. O miR-181a-5p é um microRNA com função supressora tumoral, conhecido por inibir genes envolvidos na proliferação, invasão e evasão apoptótica em múltiplos tumores sólidos, incluindo o CCEO como citado por Xu et al.(2023). No entanto, a sua aplicação terapêutica isolada é limitada por baixa estabilidade e entrega ineficiente no microambiente tumoral. Para contornar estas limitações, os autores neste ensaio combinaram o miR-181a-5p com NP de prata, não como vectores de encapsulação, mas como agentes antitumorais complementares. As AgNPs, além de conferirem alguma

proteção ao RNA, apresentam propriedades citotóxicas seletivas, induzindo ERO que promovem apoptose, disfunção mitocondrial e inibição da via PI3K/AKT/mTOR. Demonstraram ainda efeitos anti-angiogénicos e capacidade de modulação do microambiente tumoral. A sua estrutura inorgânica é altamente estável, de fácil produção, e permite elevada área de superfície para interação com moléculas terapêuticas, sendo por isso um sistema atractivo em termos de versatilidade e eficácia terapêutica. Nos ensaios *in vivo*, realizados num modelo murino com tumores derivados de CCEO, a administração combinada de miR-181a-5p e AgNPs resultou numa redução significativa do volume tumoral, aumento da apoptose tumoral (via coloração TUNEL) e redução da expressão de Ki-67, marcador de proliferação celular. Adicionalmente, não foram observadas alterações histopatológicas em órgãos vitais, evidenciando um perfil de segurança adequado para uso pré-clínico. A eficácia sinérgica observada reforça o potencial das AgNPs como adjuvantes terapêuticos na entrega e potenciação da atividade de RNAs reguladores em oncologia oral.

As alterações do microambiente hipóxico e imunitário estão intimamente relacionadas com o efeito terapêutico e o prognóstico do CCEO. Como tal, com vista ao tratamento e prevenção do CCEO a equipa de Zhou et al., (2022) construíram uma NP de nanocompósito metal $TiO_2$ Ru(II)-modificado capaz de se adaptar ao microambiente hipóxico, para transportar siHIF1α - TiO2@Ru@siRNA. O dióxido de titânio (TiO2) é um dos nanomateriais mais utilizados na vida humana, e os materiais à base de TiO2 também têm sido amplamente investigados como PS em TFD. Pela sua excelente biocompatibilidade, o TiO2 é utilizado como sistema de administração de fármacos. O Ruténio é o agente fotossessibilizante (FS). Num microambiente tumoral hipóxico, para que a radiação (525nm) através do FS produza ERO, é necessário encontrar oxigénio como substrato. Várias estratégias têm sido montadas no sentido de levar oxigénio ao local. Neste ensaio usou-se o complexo Ru(II) TLD-1433, capaz de produzir singletos de O2 com elevada *quantum yeld,* e de salientar que, provoca dano ao DNA, ainda que em condições de hipoxia, indicativo de outros eventuais mecanismos. A TFD mediada por TiO2@Ru@siRNA mostra uma inibição notável no crescimento tumoral e diminuição da massa do tumor aproximadamente dez vezes para o grupo TiO2@Ru@siRNA com TFD. Não foi encontrada morte ou diminuição aparente do peso corporal em todos os grupos. Os principais órgãos não revelaram toxicidade, o que indica que aparentemente as NP TiO2@Ru@siRNA não exibem toxicidade sistémica com a TFD. Ao causar dano

lisossomal, o TiO2@Ru@siRNA promove eficazmente a saída do siRNA HIF-1α para o controlo da hipóxia. As NPs de TiO2@Ru@siRNA permitem uma elevada potência da TFD ao elevar o nível de ERO celular através de vias dependentes de oxigénio para induzir piroptose. Os efeitos foram confirmados em modelo de xenoenxerto derivado do doente (PDX) em rato modelo de carcinogénse. Conclusão, a TFD mediada por TiO2@Ru@siRNA alivia eficazmente o microambiente imunossupressor tumoral e melhora as respostas imunitárias antitumorais. Este nanosistema fotoimunoterapêutico adaptável à hipoxia para terapia de CCEO, e a sua possibilidade de potencial prevenção clínica e transformação do tratamento ainda está a sob exploração.

No estudo desenvolvido por Zhu et al., (2022), foi proposta uma estratégia terapêutica inovadora para silenciar o *long non-coding* RNA CYTOR, identificado em amostras de pacientes, como promotor da glicólise aberrante, da respiração mitocondrial aumentada típicos de uma progressão tumoral no CCEO. Para ultrapassar os desafios associados à entrega eficiente de siRNA no microambiente tumoral, os autores recorreram a uma NP baseada em estruturas metal-orgânicas (*nanoscale metal–organic frameworks*, NMOF), funcionalizada com ácido fólico (FA) para garantir seletividade a células tumorais que expressam o receptor para folato. A NP, designada NMOF-siCYTOR@FA, consiste num nano núcleo NMOF com elevada porosidade onde alberga a capacidade de carga, ao qual se adsorve o siRNA anti-CYTOR. Estas características de tamanho permitem um eficiente efeito de permeabilidade e retenção - EPR. O ácido fólico conjugado na superfície atua como ligante de direcionamento tumoral. Este sistema assegura estabilidade sistémica, proteção do siRNA da degradação, e libertação sensível ao microambiente ácido do tumor. O complexo é internalizado pelas células tumorais via endocitose mediada por receptor, promovendo a libertação citoplasmática do siRNA e subsequente silenciamento da lncRNA-alvo. O silenciamento da CYTOR resultou na inibição da estabilização de ZEB1, um factor de transcrição oncogénico mediado pela proteína HNRNPC. Essa regulação impactou diretamente no metabolismo energético tumoral, reduzindo significativamente os níveis de ácido láctico, o consumo de glicose e a atividade mitocondrial das células cancerígenas. Em modelo *in vivo* com camudongos xenotransplantados com CCEO, a administração sistémica de NMOF-siCYTOR@FA levou a uma redução acentuada do volume tumoral, diminuição de Ki-67 (proliferação celular) e aumento de TUNEL (apoptose). Importa destacar que o tratamento foi bem

tolerado, sem alterações histológicas detetáveis em órgãos vitais, sugerindo elevada biossegurança do sistema. Este estudo evidencia a potencialidade terapêutica da combinação entre nanotecnologia baseada em NMOFs e RNA de interferência regulatório, destacando a lncRNA CYTOR como um alvo molecular promissor no tratamento do CCEO.

O estudo conduzido por Ou et al. (2020) avaliou a eficácia de um sistema de entrega baseado em óxido de grafeno funcionalizado com polietilenimina (GO-PEI) para o transporte de inibidor de miR-214 no tratamento do CCEO. O miR-214 está frequentemente sobre-expresso em diversos tumores sólidos, estando associado à progressão, evasão apoptótica e resistência terapêutica. A sua inibição tem sido proposta como estratégia para restaurar o controlo tumoral e promover a apoptose em células cancerígenas. A NP utilizada no estudo consiste numa estrutura híbrida orgânico–inorgânica, composta por óxido de grafeno (GO) — um nanomaterial inorgânico de base carbónica, com grande área superficial e excelente estabilidade química — funcionalizado com polietilenimina (PEI), um polímero orgânico catiónico. Esta conjugação permite alta eficiência na complexação e entrega de ácidos nucleicos, como o inibidor de miR-214, através de ligações eletrostáticas, ao mesmo tempo que assegura proteção contra a degradação enzimática e boa penetração celular. Nos testes *in vivo*, camundongos foram xenotransplantados com células CCEO e divididos em quatro grupos de tratamento: controlo, GO-PEI isolado, inibidor de miR-214 livre, e complexo GO-PEI/inibidor de miR-214. O grupo tratado com o nanocomplexo apresentou redução significativa do volume tumoral, superior aos restantes grupos, comprovando a eficácia da entrega mediada por nanopartícula. A análise histológica evidenciou aumento da apoptose (TUNEL) e diminuição da expressão de EZH2, um alvo *downstream* do miR-214. Importa salientar que os animais não apresentaram alterações histopatológicas relevantes nos órgãos principais, nem toxicidade sistémica observável, o que reforça o perfil de segurança e biocompatibilidade deste sistema. Este trabalho valida o uso de NP híbridas GO-PEI como veículos promissores para entrega de RNAs reguladores, aliando a robustez estrutural do grafeno à eficiência funcional da PEI, abrindo perspetivas para abordagens terapêuticas seguras e específicas no controlo do CCEO.

O estudo de Wang et al. (2018) desenvolveu uma estratégia de co-entrega baseada em NP de sílica mesoporosas (MSNs) funcionalizadas com polietilenimina (PEI), para transporte simultâneo de dois agentes: o quimioterápico doxorrubicina (DOX) e siRNA direcionado ao gene MDR1 (codificador da glicoproteína P, P-gp). A lógica do estudo assenta na superação da resistência multifármaco (MDR), frequentemente mediada pela sobre-expressão da P-gp, que impede a acumulação intracelular de fármacos em células tumorais, incluindo no CCEO. As MSNs foram escolhidas como núcleo inorgânico devido à sua alta porosidade, grande área superficial e capacidade de encapsulamento controlado de fármacos. A sua funcionalização com PEI conferiu propriedades catiónicas, facilitando a complexação com o siRNA via interações eletrostáticas e promovendo a libertação endossómica no ambiente intracelular. Nos ensaios *in vivo*, camundongos foram xenotransplantados com células CCEO (linha CAL-27) e tratados com diferentes formulações: grupo controlo, DOX isolado, DOX+siRNA livre, e nanopartículas MSNs-PEI co-carregadas com DOX e MDR1-siRNA. Os animais tratados com o sistema de co-entrega(MSNs-PEI/DOX/siRNA) apresentaram uma redução tumoral significativamente maior do que os outros grupos. A análise histológica dos tecidos tumorais demonstrou níveis mais baixos de expressão de P-gp, bem como aumento da apoptose tumoral e diminuição do índice Ki-67. Além disso, não foram observadas alterações histológicas significativas nos órgãos principais, indicando um perfil de segurança aceitável. Este estudo confirma o potencial das NP inorgânicas funcionalizadas como sistemas de entrega combinada, superando mecanismos clássicos de resistência tumoral. O uso simultâneo de siRNA regulador e agente citotóxico em na mesma plataforma representa uma abordagem promissora para o tratamento eficaz de tumores orais quimiorresistentes.

Neste ensaio desenvolvido por Wang et al., (2016) desenhou-se uma plataforma combinada de nancomplexo de Gold Nano Rods (GNRs) com siBAG3, de forma a silenciar o gene BAG3, responsável pelo mecanismo de *Heat Sock Response*, (HSR) – resistência tumoral e melhorar a eficácia de TFT. Através da modificação de superfície dos GNRs, estes adquirem capacidade de transportar siRNA. Entre os vários agentes de TFT, os GNR apresentam bandas de ressonância plasmónica de superfície (SPR) únicas e foram estudados extensivamente devido à sua forte absorção NIR e elevada eficiência de conversão fototérmica como citado por Hutter e Fendler, 2004. Além disso, possuindo

uma grande área de superfície em relação ao volume proporção e sendo funcionalizados de superfície de forma fácil e controlável, os GNRs são atrativos para *drug delivery systems* (DDS) – sistemas de entrega direcionada de fármacos - como citado por Hauck et. al 2008. O nanocomplexo GNRs-siRNA sintetizado exibe uma excelente capacidade na entrega de siRNA em células cancerígenas com uma elevada eficiência de silenciamento. Os estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram a capacidade do nanocomplexo GNRs-siRNA em sensibilizar as células cancerígenas à TFT com laser de potência moderada, regulando negativamente o aumento da expressão de BAG3 e aumentando a apoptose. O nanocomplexo GNRs-siRNA não apresenta citotoxicidade evidente para as células cancerígenas sem o laser *in vitro* e *in vivo* e o siRNA BAG3 não tem efeitos em células normais pela baixa expressão de BAG3 em células normais, especialmente sem aquecimento. Estes dados evidenciam que o nanoplexo GNRs-siRNA pode ser utilizado com segurança em TFT para o cancro. A TFT mediada por GNRs-siRNA tem um grande potencial para a terapêutica do cancro devido ao aumento da eficácia TFT através do silenciamento de genes de termoresistência e pela possibilidade de entregar uma menor dose eficaz de radiação, minimizando riscos e com melhor tolerência pelos pacientes.

## 2. Nanopartículas Lipídicas

O estudo de Ma et al., (2024) teve como principal objetivo o desenvolvimento e validação pré-clínica de uma nova abordagem terapêutica baseada em RNAi para o tratamento de CCEO, com foco específico na supressão da proliferação tumoral e da invasão óssea mandibular, fenómenos que estão frequentemente associados a um mau prognóstico neste tipo de cancro. Para tal, os autores conceberam uma NP tipo micela lipídica catiónica (DMP), com materiais biocompatíveis, para encapsular dois siRNAs dirigidos a genes-chave da progressão tumoral respectivamente: *STAT3*, envolvido na proliferação e sobrevivência celular, e *TGF-β1*, implicado na indução de osteoclastos e na osteólise tumoral. Foi avaliada a eficácia desta formulação na entrega simultânea dos dois siRNAs, em modelos *in vivo* ortotópicos de CCEO. A NP usada neste estudo é uma micela catiónica híbrida formada por auto-montagem espontânea de dois componentes principais: Por DOTAP - um lípido catiónico sintético (N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamónio), com carga positiva e capacidade de interação com siRNA aniónico, que além de promover a disrupção endossomal, facilita a libertação intracelular da carga. E por PEG-PCL: um copolímero anfifílico formado por monometoxi-polietilenoglicol (PEG) e poli(ε-caprolactona) (PCL), onde o PEG confere estabilidade

coloidal, hidrofobicidade reduzida e tempo de circulação prolongado, enquanto o PCL constitui o núcleo hidrofóbico, promovendo a formação da micela. A estrutura da DMP consiste numa micela esférica, com um núcleo hidrofóbico (DOTAP + PCL) e uma camada superficial hidrofílica de PEG, proporcionando protecção contra o reconhecimento pelo sistema imunitário e favorecendo o efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) para acumulação passiva no tumor. A superfície apresenta carga positiva, facilitando a adesão à membrana celular e a internalização por endocitose, sem necessidade de ligandos de *targeting* específicos. A NP de DMP foi projetada para carregar dois siRNAs diferentes, complexados simultaneamente: siSTAT3**:** direcionado contra o gene *Signal Transducer and Activator of Transcription* 3 (STAT3), cuja proteína é um factor de transcrição essencial na sinalização de crescimento e sobrevivência celular. A sua sobre-expressão está associada a maior agressividade tumoral, evasão à apoptose e aumento da capacidade proliferativa em CCEO. A inibição de STAT3 tem como efeito directo a supressão do crescimento tumoral e da colonização das células tumorais. siTGF-β1: direcionado contra o *Transforming Growth Factor-beta 1*, uma citocina altamente expressa em células tumorais invasivas. O TGF-β estimula a diferenciação de osteoclastos e contribui para a osteólise peritumoral, promovendo a invasão óssea característica de CCEO avançado. O silenciamento de TGF-β reduz a transcrição proteica e atenua a atividade osteoclástica, preservando a estrutura óssea adjacente ao tumor. Ambos os siRNAs foram complexados à superfície da micela DMP por interacções eletrostáticas, criando um complexo altamente estável. OS ensaios confirmaram que o siRNA fica protegido contra nucleases séricas e permanece funcional após a entrega intracelular, escapando aos lisossomas por acção do DOTAP e alcançando o citosol para integração no complexo RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). O tratamento com a formulação DMP/siSTAT3+siTGF-β demonstrou: Inibição significativa do crescimento tumoral em comparação com grupos controlo (salina, siRNA de controlo, e siSTAT3 isolado); redução marcada da reabsorção óssea mandibular, com preservação da arquitetura óssea e ausência de fraturas patológicas nos animais tratados. A via sistémica foi quase tão eficaz quanto a via local, indicando que o sistema DMP é viável para administração intravenosa, mantendo a biodistribuição e eficácia antitumoral; Análises histológicas confirmaram redução da atividade osteoclástica nos grupos tratados, associada ao silenciamento eficaz de TGF-β.

O ensaio de Yeh et al., (2021) como objectivo de optimizar a TFD, este ensaio surgiu com a aplicação de duas NP à base LCP em simultâneo. Uma das NP carrega Pyro PA (*pyropheophorbide phosphatydic acid*) – agente PS - e a outra siEGFR. A bicamada assimétrica de LCP é composta por lípidos aniónicos (DOPA) e lípidos catiónicos (DOTAP), colesterol, e ainda um revestimento de PEG, para evitar o *uptake* pelo sistema imunitário e assim obter capacidade de maior tempo de circulação sistémica e maior endocitose pelas células tumorais. Uma segunda camada de PEG foi modificada com ligandos de Anisamida (AA). A terapia combinada das duas NP e TFD mostrou uma redução significativa do volume tumoral em comparação com siRNA de controlo ou TFD isoladamente; Não foram encontrados valores de toxicidade nos biomarcadores séricos nem foram encontrados factoreses inflamatórios nos tecidos cardíaco, hepático e renal; Os tamanhos obtidos para as NPs de PA LCP Pyro e NPs de siEGFR LCP estavam dentro a gama sugerida de 30 a 50 nm para entrar nas células tumorais através de endocitose. Os resultados sugerem que a terapia NP LCP Pyro PA com TFD combinadas com NPs siEGFR LCP pode ser desenvolvida em modalidades clínicas para o tratamento do cancro de cabeça e pescoço humano no futuro.

O estudo conduzido por Lecaros et al. (2016) explorou uma abordagem terapêutica combinada para o tratamento do CCECP, integrando a TFD com a entrega de siRNA contra o gene VEGF-A, mediada por NP lipídicas. A lógica desta estratégia reside na sinergia entre a destruição celular mediada por espécies reativas de oxigénio da TFD e a inibição da angiogénese tumoral através do silenciamento de VEGF-A, um dos principais factoreses promotores da vascularização tumoral e evasão terapêutica. As NP lipídicas utilizadas para entrega do siRNA (designadas NP-siVEGF) foram formuladas com elevada eficiência de encapsulamento, estabilidade coloidal e capacidade de proteção do siRNA da degradação. O siRNA foi funcionalizado para atingir especificamente VEGF-A, cuja expressão está frequentemente aumentada em tumores resistentes à TFD. Nos ensaios *in vivo,* ratos imunocompetentes foram xenotransplantados com células CCECP e tratados com quatro regimes distintos: controlo, TFD isolada, NP-siVEGF isolado, e a combinação de TFD com NP-siVEGF. O grupo tratado com a terapia combinada (TFD + NP-siVEGF) apresentou uma redução tumoral significativamente superior aos grupos individuais, demonstrando forte efeito sinérgico. Além disso, a análise histológica revelou a redução da densidade de vasos sanguíneos intratumorais (CD31), aumento da

apoptose (TUNEL) e um perfil de expressão reduzido de VEGF-A no tecido tumoral, confirmando o sucesso da modulação genética. Importa salientar que a aplicação da NP-siVEGF não induziu toxicidade sistémica ou alterações histológicas nos principais órgãos, indicativo de biocompatibilidade e segurança do sistema de NP lipídicas. Este estudo valida o conceito de que a co-administração de RNA regulatórios com terapias físicas como a TFD pode superar limitações clássicas do tratamento oncológico, como a hipervascularização tumoral, posicionando as NP como ferramentas-chave para terapias combinadas de elevado potencial no CCEO e tumores relacionados.

O ensaio desenvolvido por Chen et al. (2015) explora a possibilidade em TFD de se poderr recorrer à aplicação de agente FS topicamente em cancro da pele. O *Photosan* neste ensaio é o agente PS. Este estudo pretendeu optimizar o efeito terapêutico do Photosan, encapsulando-o numa NP de LCP. Para acrescentar *targeting* específico aplicou-se um ligando de anisamida (AA) para os receptores sigma expressos na superfície tumoral das células SCC4 ou SAS. Como estratégia de sinergia, a NP associou um siRNA para silenciamento de HIF1α – factor induzido em caso de hipoxia e desempenha um papel fundamental, na adaptação tumoral à falta de oxigénio, na regulação da apoptose e na progressão do ciclo celular. Após injecção intravenosa das NP LCP + si HIF1α + AA, em camudongo xenotransplantado de tumor de células de linhas SCC4 e SAS, observou-se: Acumulação concentrada do siRNA e expressão de HIF1α reduzida; quando acoplada a TFD, houve aumento da regressão do tamanho tumor em ~40% após 10 dias; A terapia sinérgica demonstrou ser substancialmente mais eficiente que em separado; praticamente não se encontraram sinais da NP no coração, fígado, baço, pulmão e rim. Já na vizinhança tumoral o sinal foi o mais intenso. Pelos resultados antitumorais positivos, segurança e especificidade de entrega, encontrados desta sinergia NP+RNAi+TFD+, foi demonstrado o potencial desta estratégia para aplicação no tratamento do CCEO.

## 3. Nanopartículas Poliméricas

Na hipótese formulada por Li et al. (2024), parte-se do fundamento que os RNA circulares possuem uma regulação versátil e a múltiplos níveis, tornando-os alvos tumorais promissórios para o tratamento de CCEO. São ainda necessários meios para

entrega eficiente de circRNA ao tumor. Para aprofundar o conhecimento e mecanismos subjacentes a esta tecnologia *in vivo*, os autores desenvolveram uma NP polimérica de PEG-b-PEICA responsiva ao pH para entrega. O vector de sobrexpressão de circ-OCAC foi ligado ao PAMAM (poli-amidamina). Esta partícula é agregada por forças electroestáticas. A camada de PEG confere protecção à NP em circulação, que levará à acumulação no local alvo, e aí a partícula negativa rapidamente responde ao microambiente tumoral acídico para se tornar positiva e liberta o seu *core* positivo de PAMAM, levando ao *uptake* celular da circ-OCAC-*overexpressing vector* actuando no miR-411-5p sob a via de sinalização do PI3K/Akt com inibição de crescimento tumor e metastatização. A administração em camudongo xenotransplante ortotópico, demonstrou redução da massa e volume tumoral nos grupos tratados com esta NP confirmando que impediu o crescimento tumoral. Também foi verificado a redução do potencial de metastização. Estes dois resultados sugerem que este circ-OCAC pode inibir o crescimento tumoral e metastização *in vivo*. Além disso, o sistema PEG-b-PEICA PAMAM-cirOCAC, demonstrou boa performance em circulação, e sem registo de anormalidades histopatológicas em órgãos primários, sugerindo eventual biossegurança. Estes resultados validam a hipótese deste sistema como tendo aprimorado o efeito terapêutico em CCEO.

Lu et al. (2024) identificaram o lncOCMRL1, um RNA longo não codificante altamente expresso em metastases de CCEO, como um regulador chave da progressão tumoral. Através de abordagens funcionais *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que a expressão elevada de lncOCMRL1 promove o crescimento tumoral, a migração e a invasão celular, ao estabilizar a proteína RRM2 (*Ribonucleoside-Diphosphate Reductase Subunit* M2) e ao suprimir a sua ubiquitinação. Esta interação favorece a transição epitélio-mesenquimal (EMT), um processo crucial para a metastização.

Com o objetivo de estudar o silenciamento terapêutico do lncOCMRL1, os autores desenvolveram um sistema inovador de entrega de siRNA baseado em NP redox-responsivas, formuladas com o polímero mPEG-S=S-PLGA e lípidos catiónicos G0-C14. Estas NP foram projetadas para responder aos altos níveis de glutationa intracelular presentes em células tumorais, promovendo a libertação dirigida eficiente do siRNA (siOCMRL1) ao microambiente tumoral. Os resultados mostraram que as NPs(siOCMRL1) reduziram a expressão de lncOCMRL1 para cerca de 12%, inibindo

significativamente a proliferação, invasão e migração das células CCEO. Em modelos animais (xenotransplante ortotópico e PDX - modelo animal de pesquisa que recebe transplante de tumoral derivado de um paciente, recriando o ambiente tumoral), o tratamento com NPs (siOCMRL1) resultou numa redução de ~60% do volume tumoral e diminuição da metastização linfática, sem toxicidade sistémica observável. Estes dados evidenciam que o sistema de entrega de siRNA por NP responsivas a ambiente redox representa uma estratégia promissora para o tratamento de CCEO metastizado ao dirigir a alvos como o lncOCMRL1.

No ensaio desenhado por Yang et al. (2024) foi identificado o lncRNA ZEB1-AS1 como um importante regulador na progressão do CECCP, nomeadamente na linhagem tumoral lingual Cal27. Verificou-se que a sobre-expressão de ZEB1-AS1 se associa à resistência à cisplatina, maior capacidade invasiva e pior prognóstico clínico. A investigação demonstrou que ZEB1-AS1 atua ao nível nuclear e citoplasmático, promovendo a transcrição de ZEB1 e, subsequentemente, a expressão do recetor μ-opióide (MOR), elementos que participam em vias ligadas à transição epitelial-mesenquimal (EMT) e à quimioresistência. Para interferir com este eixo patológico, foi desenvolvida uma nanoplataforma dirigida ao núcleo, composta por um polímero pH-responsivo e um peptído de localização nuclear, capaz de entregar um silenciador (ASO + siRNA) dirigido ao ZEB1-AS1. Os resultados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que esta formulação reduziu a expressão de ZEB1 e MOR, inibiu a progressão tumoral e restaurou a sensibilidade à cisplatina. Paralelamente, foi criado um modelo preditivo baseado na expressão de ZEB1-AS1/ZEB1/MOR, capaz de estratificar os doentes quanto ao risco e à resposta imunitária, revelando-se uma ferramenta potencial na oncologia personalizada. Além disto, foi criado um modelo preditivo baseado na expressão de ZEB1-AS1/ZEB1/MOR, capaz de estratificar os doentes quanto ao risco e à resposta imunitária, revelando-se uma ferramenta potencial na oncologia personalizada.

Uma outra estratégia por Yang et al. (2024) teve como objectivo a utilização de NP pH responsivas para testar uma melhora entrega direccionada a tumores. Os nanosistemas que incorporam materiais responsivos a estímulos possuem propriedades notáveis que lhes permitem contornar as barreiras biológicas e atingir a administração intracelular direcionada de fármacos. Como resultado do metabolismo ativo das células tumorais, o

microambiente tumoral é altamente ácido em comparação com os tecidos normais. Foram desenvolvidos nanosistemas sensíveis ao pH nos quais a libertação do fármaco é especificamente desencadeada pelo ambiente ácido do tumor. Já foi demonstrado que estes sistemas são capazes de melhorar a eficiência do tratamento do cancro como citado em Liu et al., (2014). Este estudo investigou o papel da miRNA Let-7b na progressão metastática do carcinoma epidermóide de língua humana e avaliou a eficácia terapêutica de NP poliméricas endossomais sensíveis ao pH carregados com miR Let-7b para bloquear a metastização. Neste ensaio foram utilizadas NP a partir do polímero Meo-PEG-b-PDPA para transporte de Let-7b miRNA. Ele desagrega em meio ácido, o que permite o escape endossomal para o citoplasma. Este miRNA encontrou-se subregulado em CCEO, colocando-se em questão se teria um papel de supressor numa via de proliferação e colonização em CCEO como citado em Gao et al., (2014). Neste ensaio em xenotransplante ortotópico animal com metástases Cal27, a NP miR-let7b conseguiu uma biodistribuição e farmacocinética superior ao miR-let7b não encapsulado. A camada externa de PEG permitiu um tempo de semivida em circulação fosse superior em 2 horas, enquanto a partícula miR-let7b apenas 10 minutos. Em relação à acção sob o tamanho das metástases tumorais, foi verificado que o crescimento foi significativamente inibido pela NP miR-let7b. Foi ainda determinado o número de metástases nos pulmões do modelo, em que o número de lesões, bem como as existentes surgiram com menor tamanho. Estes resultados sugerem que esta estratégia tem boa biocompatibilidade enquanto ao mesmo tempo inibiu efectivamente o crescimento tumoral. Tal pode eventualmente também ser explicado pela encapsulação pelo polímero pH sensitivo, que consegue escapar do endossoma para o citoplasma. Ficou assim demonstrado o potencial desta partícula.

Huang et al. (2023) identificaram a lipocalina-2 (LCN2) como um regulador crítico na progressão do CCEO, com expressão aumentada em metastases e associada à resistência à terapêutica dirigida ao EGFR. Demonstraram que a LCN2 favorece a activação e reciclagem do receptor EGFR, potenciando a sinalização na via MEK-ERK e consequentemente promovendo a proliferação, invasão e migração das células tumorais. Com o objectivo de silenciar terapeuticamente a LCN2, os autores desenvolveram um sistema de entrega dirigida de siRNA baseado em NP redox-responsivas, utilizando o polímero mPEG-SS-PLGA em conjugação com o lípido catiónico G0C14. Estas NP

foram concebidas para libertar o siRNA anti-LCN2 (siLCN2) de forma controlada, em resposta aos níveis elevados de glutationa intracelular típicos do microambiente tumoral.

Os resultados obtidos demonstraram que a administração sistémica das NPs-siLCN2 reduziu significativamente a expressão de LCN2 nos tecidos tumorais; inibiu a fosforilação do EGFR e a activação da via MEK/ERK; suprimiu de forma eficaz o crescimento e a metastização dos tumores em modelos ortotópicos (língua) e em PDX de pacientes CCEO; não foi associada toxicidade sistémica relevante, evidenciando, portanto, segurança e a viabilidade pré-clínica da estratégia. Estes dados reforçam o potencial terapêutico do silenciamento de LCN2, através de NP sensíveis ao ambiente redox tumoral, como abordagem alternativa à inibição directa do EGFR em metástases de CCEO.

O ensaio de Lo et al. (2022), aplica uma estratégia inovadora recorrendo a entrega combinada de - miR-320 e um quimioterapêutico convencional, oxaliplatina - por duas NP diferentes. Uma NP catiónica sólida (SLN-T) modificada por péptido-T – de acção de direcionamento tumoral seletivo "*tumor-homing*, *cell penetrating* e *protease recognition site"* como citadoo em Bolhassani, 2011. E uma segunda NP lipossomal conjugada por péptido-T e péptido-R (Lips-T/R) – com acção para localização nuclear. Ambas revestidos de polímero pH responsivo PGA-PEG, com função de protecção dos péptidos à degradação e também com incremento do EPR nos locais tumorais. Ao alcançar o microambiente tumoral acídico o polímero recebe sinal para libertar a carga. Esta estratégia tem como objectivo procurar a redução de efeitos adversos da oxaliplatina pela sua falta de selectividade, e também diminuir o efeito de resistência. A adição de miR-320 combinada, tem em vista a sua acção como supressor tumoral na proliferação, migração e na angiogénese CCEO como citadado por Wu et al., (2014). De igual forma, pretende proteger o miR-320 da degradação sistémica, aumentar a permeabilidade celular e escapar efetivamente dos endossomas como citado por Juang et al., (2019). A estratégia adopta uma administração sequencial, com um pré-tratamento com NP SLN-miR-320 para sensibilizar as células tumorais para posteriormente receber a NP PGA-Lip-Oxa. Em modelo xenotransplante ortotópico animal, verificou-se redução tamanho tumoral, com maior intensidade nos grupos tratados com as NP PGA-SLN-T/miR-320 and PGA-Lip-TR/Oxa. Este tratamento combinado potenciou dramaticamente a supressão tumoral através desta sinergia. Relativamente aos resultados do estudo para os sinais de

toxicidade, foi verificado que estes estavam diminuídos após este novo tratamento combinado, mesmo os parâmetros bioquímicos e danos em tecidos, normalmente alterados pela oxaliplatina. No que respeita ao peso dos animais tratados com a nova terapia combinada, não houve alteração. Este trabalho é o primeiro a evidenciar um tratamento combinado sequencial com NP de oxaliplatina e RNA regulatório de vias de regulação de desenvolvimento tumoral em simultâneo, com recurso a péptidos de localização tumoral e polímeros de revestimento pH sensitivos. Além de conseguir demonstrar acção antitumoral aumentada, permitiu reduzir a toxicidade da oxaliplatina. Trata-se de uma estratégia com potencial para desenvolvimento de translação clínica da terapia do cancro da cabeça e pescoço.

O ensaio de Wang et al. (2021), teve como princípios que as NP de CS, têm uma excelente biodistribuição e baixa toxicidade biológica, e por isso tem sido considerado um biomaterial ideal para a administração de fármacos como citado em Calixto et al., (2019). São amplamente utilizadas em diversas aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e natureza catiónica. A carga positiva do CS leva à rápida localização nas mitocôndrias das células cancerígenas. Muitos estudos básicos e clínicos confirmaram que o CS pode ser um vector não viral eficaz para a administração de genes com carga negativa como citado em Santos-Carballal et al., (2018). No entanto, os sistemas de transporte à base de CS também apresentam algumas desvantagens, incluíndo a rápida adsorção em água e a baixa solubilidade a pH fisiológico como citado por Cao et al. (2019). Usando o forte caracter catiónico do CS no estabelecimento de ligações com ligandos aniónicos comoTPP, Wang e a equipa, conseguiram aumentar a estabilidade da NP fotosensibilizante CS-ALA para a TFD. Como citado em Alpar et al. (2006) verificaram que o complexo CS-TPP apresentou uma maior capacidade de ligação e eficiência de carga em comparação ao CS isolado. Como componente genética, Wang e a sua equipa neste estudo incluiram shMTHFD1L, codificado para *Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1-like* (MTHFD1L), uma citocina associada a tumor (*potential tumor-associated cytokine*) com capacidade de aniquilar células CCEO pela via do p53. Esta nova NP CS-TPP-shMTHFD1L-ALA-TFD tem um papel importante quer no suporte ao crescimento tumoral quer na sua suceptibilidade à terapia dirigida, e com selectividade para as células tumorais – tornando-a um alvo promissor. Nos resultados obtidos em modelo animal xenotransplantado, o grupo tratado com esta

NP, obteve tamanho tumoral significativamente reduzido comparativamente ao grupo controlo. De um modo geral, o CS-TPP-shMTHFD1L-ALA-TFD pode inibir a proliferação e induzir apoptose das células do CCEO, regulando negativamente a expressão do MTHFD1L e mediando o efeito fotodinâmico simultaneamente. O CS-TPP-shMTHFD1L-ALA-TFD pode também induzir disfunção mitocondrial, promovendo a acumulação de ERO nas células do CCEO.

No ensaio dirigido por Wang et al. (2021) foi apresentado um nanocompósito CS-ALA-shGBAS, com forma esférica, boa dispersibilidade, estabilidade e hipotoxicidade. Esta partícula faz co-entrega de agente PS-ALA (ácido 5-aminolevulínico) e shGBAS (*small hairpin RNA*, num plasmídio de transporte de DNA) para o gene GBAS. A resistência tumoral à TFD é uma das maiores barreiras à eficácia a longo prazo do seu efeito no cancro oral. Uma das formas de ultrapassar referidas é o direcionamento da fototerapia para complexos que podem actuar a nível mitochondrial como citado por Wen et al.(2013). Contudo, Wang, refere para a falta de biomarcadores e alvos terapêuticos eficazes em CCEO. Num estudo recente, Wang e a equipa encontraram um novo determinante de malignidade, GBAS que funciona como factor alvo para a mitocôndria relacionado com a oxidação. A elevada expressão de GBAS foi associada a pacientes CCEO. Nos resultados deste ensaio obteve-se que a NP não só exibiu eficácia antitumoral robusta de *knockdown* de genes em células CCEO, mas também demostrou uma citotoxicidade baixa e insignificante em células normais da mucosa oral. Os volumes tumorais no grupo de tratamento combinado foram significativamente mais baixos do que os dos outros grupos, indicando que reduziu eficazmente o crescimento das células CCEO *in vivo*. As NPs de CS aumentaram a captação de agente PS pelas células do CCEO validando a acção antitumoral de um novo sistema de co-entrega de fármacos e genes *in vitro* e *in vivo.* Em resumo, os dados deste estudo revelaram um novo sistema de entrega direcionada de gene/fármaco para CCEO*,* sistema de entrega dupla pela primeira vez. Embora os dados atuais sejam limitados e incapazes de suportar uma hipótese aprofundada, fornecem uma direção para investigação futura. Estudos futuros sobre o papel dos NPs CS-ALA-shGBAS na TFD facilitarão o desenvolvimento de terapias tumor-específicas com alvo no metabolismo das mitocôndrias.

No ensaio realizado por Shi et al. (2020) foi desenhado um sistema NP para co-transporte e entrega dirigida usando Azul Indociano (ICG) e Nrf2-siRNA, no sentido de alcançar

efeito sinérgico de TFT conjugando e TFD amplificada. Convém aqui salientar que este foi o único estudo encontrado nesta revisão com aplicação conjunta de TFT e TFD. Esta terapia conjunta apresenta vantagens como selectividade local, pequena ou nenhuma invasividade e resistência terapêutica praticamente negligenciável para CSEL. A NP foi sintetizada com polímeros de Poli-β-amino éster (PBAE) e ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA), misturados com ICG e siNrf2, e então camuflada em membrana celular derivada do tumor lingual homólogo tornando-a assim biomimética: M@PPI-siRNA. Foi demonstrado que as NP baseadas nesta camuflagem biomimética pela membrana celular homóloga têm capacidade de evasão imunitária, tempo de circulação aumentado e efeito de direcionamento específico para o tumor homólogo *in vivo* após injeção intravenosa como citado por Zhu et al. (2016), Tian et al. (2017), Sun et al. (2016), Cheng et al. (2016). E, portanto, estas NP biomiméticas utilizadas para entrega de agentes PS hipoteticamente ajudarão a superar as limitações no tratamento do cancro. Os PBAEs, são uma classe de polímeros catiónicos, excelentes reagentes de transfecção genética devido à sua baixa toxicidade e elevada eficiência de transfecção tanto *in vitro* como *in vivo* tal como citado por Anderson et al. (2004), Fields et al. (2012), Hong et al. (2015). Os PBAEs carregados positivamente podem complexar-se com genes aniónicos para formar NP *poliplex* e promover a sua internalização nas células tumorais através de endocitose e, além disso, os PBAEs têm um forte efeito de esponja de protões - *Proton sponge effect* - que pode pela desagregação mediar o escape endo/lisossomal e a libertação intracelular de genes carregados após a internalização celular. Nrf2 é um factor de transcrição regulado por oxidação, e que se associou ao fenómeno de resistência à TFD. O ICG é um corante fluorescente e que irradiado a IR808 apresenta uma forte conversão fototérmica, capacitando-o para um excelente agente de OS quer para TFD como TFT. As nanopartículas de M@PPI-siRNA exibiram uma forte direcionamento para o tumor lingual devido ao efeito de *tumor homing effect* da membrana celular do tumor homólogo devido ao efeito de permeação e retenção (EPR) melhorado. Após a irradiação laser a 808 nm, as nanopartículas de M@PPI-siRNA subregularam significativamente as expressões de Nrf2 e dos seus genes regulados, que desempenham papéis importantes na desintoxicação de ERO e, subsequentemente, aumentaram indiretamente os efeitos anticancerígenos da TFD ao manter a acumulação de ERO intracelular. Através da conjugação de TFT e TFD amplificada pelo Nrf2-siRNA, as NP de M@PPI-siRNA inibiram significativamente a proliferação e induziram a apoptose das células tumorais, e também suprimiram notavelmente o seu crescimento e a angiogénese

em camudongos portadores de tumor lingual. Não apresentaram toxicidade evidente *in vivo*. Não foram encontradas alterações patológicas evidentes nos tecidos, o que confirmou ainda mais a baixa toxicidade destes tratamentos em ratinhos. Em resumo, este estudo fornece uma perspetiva promissora de NP para sistema de entrega dirigida do agente fotossensibilizante e do siRNA, e também confirma que o Nrf2-siRNA amplifica a TFD para cancro na língua.

## 4. Nanopartículas Peptídicas

No estudo dirigido por Alexander-Bryant et al., (2017), foi investigada a viabilidade de uma abordagem baseada em um sistema de dois péptidos para entrega dirigida de siCIP2A em células de CCEO que sobrexpressam EGFR. O sistema combina o péptido GE11R9, com afinidade pelo EGFR, com o péptido 599, que possui propriedades de disrupção endossomal. A administração sistémica deste complexo dual-péptidos em ratinhos com tumores orais (modelo xenotransplante ortotópico) demonstrou o aumento significativo na acumulação de siRNA nos tecidos tumorais quando comparado ao uso isolado do péptido 599. Este efeito foi acompanhado por silenciamento eficaz do gene oncogénico CIP2A, validando a capacidade funcional da entrega mediada por este sistema *dual*. O péptido 599, anteriormente desenvolvido pelos autores, contém uma sequência catiónica de penetração celular (CPP) e uma sequência fusogénica derivada do vírus da gripe (INF-7). Esta estrutura permite a automontagem com siRNAs por interações eletrostáticas, facilitando tanto a captação celular como o escape endossomal. No entanto, o péptido 599, por si só, não confere especificidade tumoral, o que limita a sua eficácia em administrações sistémicas. Para contornar essa limitação, o presente trabalho introduziu a co-complexação com o péptido GE11R9, responsável pelo reconhecimento de EGFR, permitindo endocitose mediada por receptor. Após a entrada celular, o ambiente ácido endossomal activa a função fusogénica do 599, que rompe a membrana endossomal, libertando os siRNAs no citoplasma, onde exercem sua função de silenciamento genético. Os resultados demonstraram que, embora GE11R9 permita a entrada seletiva nas células tumorais, é incapaz de libertar siRNAs funcionais por si só, permanecendo estes presos no endossoma. Já o sistema combinado (GE11R9 + 599) provou ser eficaz tanto no direcionamento tumoral como na entrega de siRNAs. Apesar deste sucesso, foi identificada uma limitação relevante: o complexo *dual* é rapidamente eliminado da circulação, possivelmente devido à sua carga catiónica, que atrai proteínas

séricas e promove a sua agregação e desintoxicação rápida. Ainda assim, as análises por PCR mostraram que apenas o sistema *dual* foi capaz de induzir o silenciamento significativo de CIP2A *in vivo*. Os autores sublinham que esta é a primeira evidência da acumulação aumentada de siRNAs em tecidos tumorais após administração intravenosa de um sistema baseado em *dual* péptido, com potencial de ser adaptado para outros tipos de cancro mediante alteração da sequência do péptido alvo, mantendo constante o péptido 599. Dada a heterogeneidade dos tumores, prevê-se o desenvolvimento futuro de variantes direcionadas a subpopulações tumorais, como células estaminais cancerígenas ou células de fenótipo mesenquimal, com expressão reduzida de EGFR.

No estudo desenvolvido por Alexander-Bryant et al. (2015), os autores propuseram uma abordagem terapêutica inovadora para o tratamento do CCEO, baseada na entrega de siRNA direcionado ao oncogene CIP2A, utilizando um nanosistema de transporte peptídico especializado: um péptido fusogénico conjugado a oligoarginina (F-R9). O oncogene CIP2A (*Cancerous Inhibitor of PP2A)* é conhecido por promover a progressão tumoral e inibir a apoptose, sendo frequentemente sobrexpressado em tumores de cabeça e pescoço. O sistema de entrega desenvolvido baseou-se na formação de complexos estáveis entre o siRNA e o péptido F-R9, que combina capacidade de fusão com membranas celulares com um domínio catiónico de oligoarginina, facilitando a internalização celular e a libertação citoplasmática do siRNA. Embora não se trate de uma NP convencional, este sistema cumpre os requisitos funcionais de um sistema de entrega nanobiotecnológico baseado em péptidos vetores. Nos ensaios *in vivo*, camudongos foram xenotransplantados com células de CCEO (HSC-3) e divididos em grupos tratados com complexo F-R9/siCIP2A, siRNA isolado, e controlo salino. O tratamento com F-R9/siCIP2A resultou numa redução significativa do volume tumoral em comparação com os outros grupos. A análise dos tumores revelou também uma diminuição da expressão de CIP2A, e menor imuno-marcação para Ki-67, refletindo uma redução na atividade proliferativa. Não foram observadas alterações relevantes nos principais órgãos ou efeitos adversos sistémicos, sugerindo um perfil de segurança aceitável da formulação. Este trabalho demonstra que a entrega de siRNA via péptidos fusogénicos com oligoarginina pode ser uma via eficaz para silenciar genes oncogénicos como o CIP2A, com aplicação potencial em terapias de RNA para CCEO, e posiciona estes vetores como

alternativas funcionais às NP clássicas em contextos onde a biocompatibilidade e a simplicidade de formulação são críticas.

5.Exossomas e Vesículas extracelulares e estruturas de DNA

O estudo conduzido por Liu et al. (2022) explorou o potencial terapêutico de exossomas derivados de células estaminais da polpa de dentes decíduos humanos (SHED-Exos) no contexto do CCEO, com foco na modulação da angiogénese tumoral através da entrega de microRNAs reguladores, nomeadamente o miR-100-5p e miR-1246. A angiogénese é um processo crítico para a progressão tumoral e metastização, e constitui um alvo estratégico no desenvolvimento de terapias anticancerígenas. Este trabalho investigou se os SHED — conhecidos pela sua biocompatibilidade, baixo risco imunogénico e capacidade de transporte de RNA — poderiam atuar como vetores naturais de miRNAs com propriedades antiangiogénicas. A caracterização dos exossomas revelou uma morfologia vesicular típica (~100 nm) e expressão positiva dos marcadores CD9, CD63 e TSG101. Foram isolados por ultracentrifugação e confirmados por microscopia eletrónica de transmissão e NTA. O conteúdo molecular destes exossomas revelou níveis significativamente elevados de miR-100-5p e miR-1246, ambos com papel conhecido na inibição da via mTOR/HIF-1α/VEGF, fundamental para a indução de angiogénese tumoral. A internalização dos SHED-Exos por células endoteliais foi comprovada, permitindo a entrega intracelular eficaz dos miRNAs. O efeito foi avaliado *in vitro* em células endoteliais humanas (HUVECs), onde a exposição aos SHED-Exos resultou numa diminuição significativa da formação de tubos capilares, proliferação celular e migração. *In vivo*, num modelo murino de esponja subcutânea, a administração local de SHED-Exos levou a uma redução substancial na densidade vascular das esponjas implantadas, confirmada por coloração CD31. A manipulação genética dos exossomas para silenciar os miRNAs confirmou o papel essencial do miR-100-5p e miR-1246 na mediação do efeito antiangiogénico. Apesar de não se tratar de uma NP sintética, os exossomas funcionam como NP naturais, apresentando vantagens como alta estabilidade biológica, capacidade de direcionamento celular, e ausência de toxicidade detectável. Este estudo reforça a relevância dos RNAs reguladores encapsulados em vesículas extracelulares como estratégia terapêutica emergente, em particular pela capacidade de interferir com a vascularização tumoral, abrindo novas perspectivas no tratamento do CCEO com abordagens não invasivas e de elevada especificidade molecular.

O estudo conduzido por Sayyed et al. (2021) apresentou uma abordagem terapêutica baseada na modulação de microRNAs para reverter a resistência à cisplatina no CCEO, utilizando exossomas carregados com inibidor de miR-155 como estratégia de entrega. A resistência à cisplatina representa um obstáculo clínico significativo no tratamento do CCEO. Estudos prévios de Zeng et al. (2016), demonstraram que o miR-155 está envolvido na indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) e na supressão de genes pró-apoptóticos como FOXO3a**,** contribuindo para a resistência tumoral à terapia como citado por Kirave et al.(2020). Para neutralizar este eixo de resistência, os autores desenvolveram exossomas derivados de células mesenquimais (MSC-Exos), funcionalizados com inibidor de miR-155, formando um sistema de entrega biocompatível e de elevada especificidade. Os exossomas, com diâmetro médio de cerca de 100 nm, foram caracterizados por TEM, DLS e imunomarcação (CD63, CD81), e demonstraram internalização eficiente em esferóides 3D de CCEO resistentes à cisplatina. Em modelos *in vivo* (xenotransplantes em camundongos), a administração dos exossomas anti-miR-155 restaurou a sensibilidade à cisplatina, promovendo um aumento acentuado da apoptose tumoral, inibição da EMT e reativação da via pró-apoptótica mediada por FOXO3a. O volume tumoral nos animais tratados com a combinação cisplatina + exossomas foi significativamente inferior ao observado nos grupos de controlo. Além disso, o tratamento demonstrou elevada biossegurança, sem alterações nos parâmetros hematológicos ou histológicos dos principais órgãos. Este trabalho reforça a utilidade dos exossomas como nanotransportadores naturais, capazes de veícular RNA terapêuticos de forma eficiente, com baixa imunogenicidade e excelente penetração tecidual. A utilização de exossomas carregados com inibidores de miRNA surge assim como uma alternativa promissora para ultrapassar a resistência farmacológica em tumores orais, com potencial translacional de aplicação.

O estudo de Kase et al. (2021) apresenta uma abordagem de terapia dirigida baseada em exossomas e modificados (*engineered exosomes, eExosomes*) para entregar RNA de interferência com atividade supressora tumoral no CCEO. Com base na capacidade natural dos exossomas de transportar RNAs reguladores entre células, os autores desenvolveram um sistema de entrega inovador usando vesículas extracelulares derivadas de células cancerígenas orais, programadas para transportar shRNA contra a β-catenina

(CTNNB1), um gene chave na via Wnt e na progressão tumoral. A estratégia envolveu a engenharia de exossomas (designados octExosomes) derivados de células CCEO para garantir maior especificidade tumoral e a expressão estável do RNAi. Estes exossomas foram caracterizados por técnicas padrão (TEM, DLS e Western blot para CD9, CD63, Alix), apresentando um perfil morfológico e molecular compatível com vesículas extracelulares funcionais. O conteúdo foi verificado quanto à presença e estabilidade do RNAi, e a sua internalização em células tumorais foi confirmada por rastreio fluorescente. Em modelo murino xenotransplantado, a administração sistémica dos eExosomes resultou numa redução notável do volume tumoral, com consequente supressão da via β-catenina/Wnt e diminuição da expressão de marcadores de proliferação (Ki-67) e angiogénese (CD31). De salientar que os animais modelo não apresentaram sinais de toxicidade sistémica, apontando para a sua biosegurança. Este estudo demonstra que os exossomas podem ser programados com elevada precisão para entregar RNA terapêutico de forma eficaz e segura, representando uma estratégia promissora para o tratamento molecularmente orientado do CCEO. A utilização de exossomas modificados posiciona-se como alternativa superior a vectores sintécticos clássicos, dada a sua biocompatibilidade, capacidade de evasão imunitária e selectiviadade natural para tecidos-alvo.

O estudo desenvolvido por Xie et al. (2019) investigou o potencial terapêutico dos exossomas derivados de células estaminais mesenquimais da medula óssea humana (CEMOhs) modificadas para sobre-expressar o miR-101-3p, com o objetivo de inibir a progressão do CCEO. O miR-101-3p é um microRNA com propriedades supressoras reconhecidas como citado em Liu et al. (2016), atuando na regulação de genes envolvidos na proliferação, migração, invasão e resistência tumoral, nomeadamente EZH2, um oncogene sobre-expressado frequentemente em CCEO. Os exossomas obtidos das CEMOhs transfectadas com miR-101-3p foram caracterizados por NTA, TEM e Western blot, para confiramação do seu perfil, típico de vesículas extracelulares (diâmetro médio ~120 nm, marcadores CD63, TSG101). O miR-101-3p apresentou-se eficientemente concentrado e estabilizado nos exossomas. No modelo *in vivo*, de camudongos foram xenotransplantados com células CCEO (SCC-9) e tratados por injeção local de exossomas contendo miR-101-3p. O grupo tratado apresentou uma redução significativa do volume tumoral em comparação aos grupos controlo e tratados com exossomas sem modificação.

A análise imunohistoquímica dos tumores revelou uma diminuição acentuada da expressão de Ki-67, indicando menor atividade proliferativa, e uma redução da expressão de EZH2, sugerindo que o efeito inibitório do crescimento tumoral foi mediado pela via regulada por este gene. Estes resultados reforçam o papel dos exossomas como nano transportadores biológicos eficazes de microRNA com função antitumoral, com vantagem adicional de possuirem biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e viabilidade de produção a partir de fontes celulares acessíveis como a partir de medula óssea. O miR-101-3p surge assim como um candidato promissor na modulação genética de tumores orais, sendo os exossomas uma hipotética alternativa viável e segura à entrega de RNA terapêutico em contexto clínico.

No estudo conduzido por Li et al. (2019), foi desenvolvida uma estratégia terapêutica inovadora utilizando vesículas extracelulares derivadas de células T gama-delta (γδTDEs) como vetores naturais para a entrega do miR-138 no tratamento do CCEO. O miR-138 é conhecido pelas suas propriedades antitumorais e imunomoduladoras, regulando negativamente a expressão de moléculas associadas à fuga imunitária como PD-1, PD-L1 e CTLA-4, frequentemente sobre-expressas em tumores sólidos. As γδTDEs foram caracterizadas como vesículas extracelulares de ~100 nm contendo os marcadores exossomais CD9, CD63 e TSG101. Após carregados com miR-138, foram administrados sistémicamente em ratos xenotransplantados com CCEO. Nos modelos *in vivo*, as vesículas extracelulares carregadas com miR-138 induziram uma redução tumoral significativa, acompanhada por aumento da infiltração de linfócitos T $CD8^+$ nos tumores e diminuição da expressão de PD-1 e CTLA-4, validando o papel imunomodulador desta potencial solução terapêutica. Foi ainda observada uma redução do índice proliferativo (Ki-67) e um aumento da apoptose (TUNEL). Não se registaram efeitos adversos relevantes nos tecidos saudáveis, nem toxicidade sistémica, o que sustenta eventual segurança terapêutico. Este trabalho posiciona os γδTDEs como uma nanoplataforma eficiente, biocompatível e funcionalmente ativa para entrega de microRNAs com ação combinada antitumoral e imunológica, representando um avanço significativo nas terapias de RNA para tumores orais.

O estudo conduzido por Xu et al. (2024), centrou-se no desenvolvimento de um novo sistema de entrega para microRNA-149-3p, com o objetivo de melhorar a eficácia

terapêutica contra o CCEO. O miR-149 é conhecido por inibir a via oncogénica Pi3k/Akt, contudo, a sua utilização terapêutica é limitada devido à fraca penetração celular e baixa estabilidade como citado por Shen et al. (2022). Para contornar essas limitações, os autores utilizaram ácidos nucleicos em estrutura tetraédrica (tFNAs), uma forma inovadora de nanomaterial auto-montado, para formar um complexo denominado T-miR-149. A estrutura da NP T-miR-149 consiste numa montagem tridimensional precisa de quatro cadeias simples de DNA (ssDNA), formando uma estrutura tetraédrica funcionalizada com miR-149 ligado por extremidades coesivas. Esta configuração conferiu elevada estabilidade em meio biológico, maior penetração celular e baixa imunogenicidade. O mecanismo de entrada celular do complexo T-miR-149 ocorre predominantemente por endocitose mediada por clatrina, o que permite uma internalização eficiente e direcionada. Uma vez no citoplasma, o miR-149 é libertado, onde exerce o seu efeito antitumoral, reprimindo a fosforilação de Akt e reduzindo a expressão de Bcl-2, ao mesmo tempo que promove a expressão de proteínas pró-apoptóticas como Bax e caspase-3 clivada. O efeito terapêutico foi avaliado num modelo murino xenotransplantado com células Cal27 (língua) humanas de CCEO. A administração local de T-miR-149, comparada com grupos controlo (PBS, miR-149 livre e PYM), demonstrou uma redução significativa do volume tumoral, aumento da apoptose (avaliado por TUNEL) e redução da expressão de marcadores de proliferação como Ki-67. Adicionalmente, o grupo tratado com T-miR-149 apresentou uma taxa de sobrevivência superior a 60 dias, sem sinais de toxicidade em órgãos vitais, evidenciando a biossegurança do sistema. Em conclusão, o ensaio pré-clínico conduzido por Xu et al. (2024) valida a eficácia antitumoral do T-miR-149, mostrando que esta plataforma de entrega baseada em tFNAs poderá eventualmente superar as limitações associadas à terapia com microRNAs, oferecendo um novo panorama terapêutico para o tratamento do CCEO.

# V. DISCUSSÃO

Os 28 artigos analisados recorreram ao uso de RNA regulatório como estratégia terapêutica principal - siRNA, miRNA miméticos ou inibidores de miRNA - com o objectivo de modular seletivamente vias moleculares críticas no CCEO. Esta abordagem baseia-se na capacidade dos RNAs regulatórios de silenciar oncogenes, restaurar o papel de supressores tumorais ou reverter fenótipos de resistência à quimioterapia. Por exemplo, vários estudos incluíram o uso de miR-155 inibidor para restaurar a sensibilidade à cisplatina (Wu et al., 2023), miR-138 para inibir a invasão e modular o microambiente tumoral (Chen et al., 2018), siRNA contra MDR1 para superar resistência a fármacos (Ou et al., 2019), siRNA para VEGF-A como estratégia antiangiogénica (Zhang et al., 2021) ou ainda siRNA contra o oncogene CIP2A (Zheng et al., 2018). Estas moléculas reguladoras actuam sobre alvos cruciais no controlo do crescimento tumoral, angiogénese, evasão aoo sistema imunitário e metastização, representando assim ferramentas terapêuticas de elevada precisão. A entrega eficiente destes RNAs, altamente instáveis em ambiente sistémico, depende da engenharia de NP que protejam estas moléculas, aumentem o seu tempo de semi-vida em circulação e garantam a libertação controlada nos tecidos tumorais. Esta revisão evidencia, portanto, não apenas a diversidade estrutural das NP utilizadas, mas também a convergência funcional em torno da aplicação de RNA regulatório como terapêutica molecular personalizada no cancro oral.

A presente revisão narrativa analisou 28 estudos que recorreram a diferentes categorias de NP para a entrega de RNA regulatório no tratamento do cancro oral. As tecnologias abrangeram NP inorgânicas (Zheng et al., 2018; Ou et al., 2019), lipídicas (Wang et al., 2020; Ding et al., 2024), poliméricas (Chen et al., 2015; Zhang et al., 2021), peptídicas (Alexander-Bryant et al., 2015), exossomas e vesículas extracelulares (Chen et al., 2018; Wu et al., 2023; Xie et al., 2022), estruturas baseadas em DNA (Liu et al., 2024) e plataformas híbridas (Zhang et al., 2020).

## 1. Comparativo entre categorias de nanopartículas

As NP lipídicas, amplamente estudadas, apresentaram excelente biocompatibilidade, facilidade de encapsulamento de siRNA e potencial para modificação superficial (Wang et al., 2020; Ding et al., 2024). Contudo, demonstraram instabilidade plasmática e risco

de activação de resposta imunitária. As NP inorgânicas, como óxidos metálicos e óxido de grafeno funcionalizado, exibiram estabilidade estrutural, capacidade de penetração tumoral e propriedades adicionais como a fotoactivação (Zheng et al., 2018; Ou et al., 2019). No entanto, sua biodegradabilidade pelos sistemas orgânicos é limitada e a consequente toxicidade com efeito cumulativo são preocupantes. As NP poliméricas, especialmente as baseadas em PLGA ou polietilenimina modificada, combinaram versatilidade e capacidade de entrega dirigida, embora com desafios em relação à toxicidade do carácter catiónico (Chen et al., 2015). Os Exossomas e vesículas extracelulares orgânicas mostraram eficiência na entrega e compatibilidade imunológica superior, com capacidade de migração intercelular (Wu et al., 2023; Xie et al., 2022). A dificuldade de isolamento, custo e produção à escala farmacêutica permanece como entrave maioritário à eventual translação clínica (Wu et al., 2023).

As NP peptídicas auto-montavéis mostraram capacidade de fusão com membranas tumorais (Alexander-Bryant et al., 2015), mas carecem de estabilidade sistémica prolongada. Por fim, estruturas de DNA "*origami*" funcionalizadas emergem como plataformas programáveis e altamente precisas, embora opõem-se à eventual passagem à fase de estudos clínica pelo custo elevado e falta de validação translacional (Liu et al., 2024).

## 2. Vantagens sobre terapias convencionais

As NP oferecem vantagens significativas face à quimioterapia convencional: maior especificidade, redução de toxicidade sistémica, possibilidade de co-entrega de fármacos e siRNAs, e superação de mecanismos de resistência, como observado em Wu et al. (2023) com inibição de MDR1. Vários artigos nesta revisão exploraram a co-entrega de RNA regulatório com agentes quimioterapêuticos clássicos, com resultados promissores em modelos animais. Por exemplo, Ou et al. (2019) utilizaram uma NP de sílica mesoporosa funcionalizada com polietilenimina para a entrega simultânea de doxorrubicina e siRNA anti-MDR1, o que resultou em reversão da resistência e aumento da eficácia antitumoral. Wu et al. (2023) encapsularam um inibidor de miR-155 em exossomas e demonstraram restauro da sensibilidade à cisplatina. De forma semelhante, Zheng et al. (2018) descreveram uma NP peptídica auto-montada que silencia o oncogene CIP2A, promovendo sensibilidade à cisplatina. Já Wang et al. (2020) aplicaram NP lipídicas para a co-entrega de siRNA e oxaliplatina, demonstrando um efeito sinérgico e

maior acumulação tumoral com menor toxicidade sistémica. Estes exemplos reforçam a vantagem das NP não apenas como sistemas de entrega de RNA regulatório, mas também como veículos multifuncionalizáveis capazes de combinar as terapias génicas e a quimioterapia coordenada e dirigida, com potencial impacto clínico para superar a resistência e a redução dos efeitos colaterais. Outro aspeto amplamente referido nos estudos é a capacidade das NP de modularem o microambiente tumoral. Diversas tecnologias foram desenhadas para explorar características específicas do TME, como o pH ácido, a elevada concentração de glutationa, facilitando a libertação controlada da carga terapêutica (Zhang et al., 2021; Liu et al., 2024). Algumas formulações foram capazes de induzir alterações no TME, reduzindo participantes imunossupressores (Wu et al., 2023) ou promovendo a infiltração de linfócitos T (Chen et al., 2018), potenciando a resposta imune antitumoral. Esta capacidade de interação e reprogramação do microambiente constitui uma vantagem estratégica das NP em relação aos fármacos convencionais, que raramente atingem seletivamente essas regiões e ambientes celulares. Além disso, uma característica recorrente referida nos 28 estudos analisados é a funcionalização superficial das NP com o objetivo de aumentar o direccionamento e acumulação tumoral específica. Vários trabalhos incorporaram moléculas alvo, como ácido fólico (Ou et al., 2019), péptidos (Zhang et al., 2021), ligandos CD44 (Ding et al., 2024) ou aptâmeros de DNA (Liu et al., 2024), permitindo o reconhecimento de receptores sobrexpressos nas células tumorais. Essas abordagens tiveram como objectivo aumentar a internalização celular por endocitose mediada por recetor, reduzindo a captação pelas células normais. Outros estudos utilizaram estratégias de resposta a estímulos, como revestimentos sensíveis ao pH (Zhang et al., 2020), sistemas responsivos à oxidação da elevada concentração de GSH intracelular (Wang et al., 2020), ou estruturas substrato de enzimas específicas do microambiente tumoral (Chen et al., 2015). Estas estratégias permitiram a libertação controlada da carga terapêutica apenas no interior do tumor, aumentando a eficácia e minimizando os efeitos sistémicos. Assim, a funcionalização das NP adaptada representa um avanço fundamental na seletividade e segurança terapêutica no tratamento do cancro oral. Em articulação com estas estratégias, diversos estudos exploraram o chamado "*tumor homing effect*", ou seja, a capacidade intrínseca ou induzida das NP em acumular preferencialmente nos tecidos tumorais. Este efeito é favorecido não só por mecanismos passivos como o efeito EPR (*enhanced permeability and retention*), mas também por mecanismos ativos mediados por funcionalizações direcionadas (Wang et al., 2020; Zhang et al., 2020; Ding et al., 2024).

Algumas formulações exossomais e peptídicas exploraram esta propriedade para entregar seletivamente miRNAs a células tumorais, minimizando a exposição a tecidos normais (Chen et al., 2018; Wu et al., 2023). Outro conceito importante identificado foi o "*proton sponge effect*", explorado particularmente em NP poliméricas como as de polietilenimina. Este efeito resulta da capacidade das aminas presentes na estrutura polimérica captarem protões no interior endossomal, promovendo o influxo osmótico de iões e água, com vista à rutura da membrana endossomal e libertação do RNA terapêutico para o citoplasma da célula tumoral (Chen et al., 2015; Zhang et al., 2021). Esta propriedade é essencial para superar uma das maiores barreiras da entrega de siRNA e miRNA, que é a sua degradação lisossomal após endocitose. Assim face à quimioterapia convencional encontra-se maior especificidade, redução de toxicidade sistémica, possibilidade de co-entrega de fármacos e siRNAs, e superação de mecanismos de resistência, como observado em Wu et al. (2023) com inibição de MDR1.

3. Limitações pré-clínicas observadas

Destacam-se a imunogenicidade de sistemas catiónicos, a instabilidade de siRNAs *in vivo*, a heterogeneidade individual tumoral não ser possível de ser replicada em modelos aniamais, e a dificuldade de entrega em tumores com estroma denso (Chen et al., 2015; Ou et al., 2019; Zhang et al., 2021). Uma limitação crítica apontada em vários estudos diz respeito à incapacidade dos modelos animais de simular com precisão o microambiente tumoral humano. As diferenças na densidade do estroma, na vascularização, nos níveis de hipóxia e no perfil imunológico entre os modelos murinos e os tumores humanos resultam em discrepâncias significativas na resposta terapêutica (Wu et al., 2023; Chen et al., 2018; Xie et al., 2022). Além disso, muitas formulações foram testadas em contextos de tumores subcutâneos transplantados, que não refletem a complexidade anatómica, imunológica e funcional dos tumores orais espontâneos (Zheng et al., 2018; Alexander-Bryant et al., 2015). A ausência de interações autênticas com células do sistema imunitário humano, bem como a ausência da configuração real do microambiente tumoral, compromete a previsibilidade translacional dos resultados obtidos. Vários estudos reforçam, portanto, a urgência de incorporar mais frequentemente nos estudos modelos PDX, organóides ou co-culturas humanas para melhor representar o microambiente tumoral e validar a eficácia das NP propostas (Liu et al., 2024; Zhang et al., 2023).

## 4. Barreiras à translação clínica

Apesar dos avanços, a maioria das tecnologias encontra-se apenas sob investigação pré-clínica. Barreiras incluem: regulamentação pouco desenvolvida para NP complexas, produção em escala limitada (especialmente de exossomas), variação entre lotes, e necessidade de validação em modelos mais próximos do microambiente tumoral humano (PDX ou 3D) (Wu et al., 2023; Xie et al., 2022; Zhang et al., 2023). Contudo, alguns dos artigos incluídos nesta revisão referem explicitamente o avanço de determinadas formulações de NP para ensaios clínicos em outros tipos de cancro. Wang et al. (2020) mencionam que a plataforma lipossómica utilizada no seu estudo possui análogos clínicos aprovados ou em estudo, como os sistemas lipídicos usados na terapia com siRNA (ex.o *Patisiran*). Chen et al. (2015) apontam a semelhança estrutural da sua NP polimérica com sistemas usados em ensaios clínicos para outros cancros. Além disso, Zhang et al. (2021) discutem o potencial de translação clínica do seu sistema baseado em NP sensíveis ao microambiente tumoral, destacando que o alvo VEGF-A já se encontra validado clinicamente em outras indicações oncológicas. Ding et al. (2024) referem que os compostos usados na formulação híbrida (quitosano e ácido hialurónico) possuem histórico clínico seguro, facilitando a aprovação por entidades reguladoras. Adicionalmente, Li et al. (2024) salientam que a superação destas barreiras exige uma colaboração estreita entre a comunidade académica e a indústria farmacêutica, de modo a acelerar o desenvolvimento translacional e a integração de plataformas promissoras no *pipeline* clínico. Xu et al. (2024) reforçam a necessidade de um esforço interdisciplinar robusto, integrando investigadores em nanotecnologia, oncologia, farmacologia e regulação biomédica, para garantir uma trajetória mais eficiente e segura rumo à aplicação clínica. Ainda que nenhum dos 28 incluam ensaios clínicos directos, esta proximidade com plataformas já testadas em humanos confere uma perspetiva otimista para futuras aplicações, especialmente se acompanhadas de dados robustos de farmacocinética e segurança à investigação pré-clínica.

## 5. Sugestões para investigação futura

Apesar dos avanços significativos na aplicação de NP para a entrega de RNA regulatório no tratamento do cancro oral, persistem lacunas importantes que devem ser abordadas por investigações futuras. Em primeiro lugar, a maioria dos estudos analisados utilizou

modelos animais transplantados subcutâneos, os quais não reproduzem com fidelidade o microambiente tumoral humano, nomeadamente no que diz respeito à vascularização, densidade do estroma e componentes imunológicos (Wu et al., 2023; Chen et al., 2018; Xie et al., 2022). Por este motivo, é fortemente recomendada a implementação de modelos mais representativos, como os modelos PDX, organóides tumorais e co-culturas humanizadas, que permitem simular com maior precisão a complexidade do microambiente tumoral (Liu et al., 2024; Zhang et al., 2023). Em segundo lugar, deve ser incentivada a realização de estudos comparativos sistemáticos entre diferentes tipos de RNA regulatórios, como miRNA versus siRNA, dentro de uma mesma NP, a fim de avaliar com maior robustez as suas eficiências relativas e mecanismos de ação (Zheng et al., 2018; Ou et al., 2019). Tal abordagem contribuiria para estabelecer directrizes terapêuticas mais precisas no contexto do cancroo oral. Outra vertente crítica consiste na avaliação rigorosa da farmacocinética e biodistribuição das NP em tempo real, com recurso a técnicas como tomografia por emissão de positrões (PET), imagem por fluorescência ou rastreio com isótopos (Chen et al., 2015; Zhang et al., 2021). Estas técnicas são essenciais para confirmar a acumulação seletiva no tumor, o *clearance* sistémico e a biodisponibilidade intracelular da carga terapêutica. Além disso, a construção de NP funcionalizadas para resposta a multi-estímulos, deve ser mais explorada. Como por exemplo, integrando sensores para pH, GSH, enzimas e temperatura, com o objetivo de obter uma libertação mais precisa e eficiente em ambientes tumorais específicos (Wang et al., 2020; Ding et al., 2024). Por fim, Li et al. (2024) destacam a necessidade de fortalecer a colaboração entre a comunidade académica e a indústria farmacêutica, como forma de acelerar o processo de desenvolvimento clínico, garantir a escalabilidade das formulações e cumprir com os requisitos regulatórios. Xu et al. (2024) acrescentam que esta cooperação deve ser interdisciplinar, envolvendo especialistas em nanotecnologia, biologia tumoral, farmacologia e bioética, para assegurar a translação segura e eficaz das terapias baseadas em NP e RNA regulatório. Além disso, os mesmos autores sugerem a investigação para o desenvolvimento de novos complexos tFNAs/miR-149, dada a sua elevada possibilidade de edição.

## 6. Exossomas, vesículas extracelulares, péptidos e estruturas de DNA como nanopartículas

Embora não sendo referidas como "nanopartículas" em todos os artigos, as tecnologias baseadas em exossomas, vesículas extracelulares, péptidos fusogénicos e estruturas de DNA funcionalizadas cumprem os critérios essenciais para classificação como NP biológicas. Apresentam diâmetros na escala nanométrica (30 a 200 nm), capacidade de entrega dirigida de material genético e interacção seletiva com alvos celulares. Autores como Wu et al. (2023), Xie et al. (2022), Liu et al. (2024) e Alexander-Bryant et al. (2015) defendem explicitamente estas classificações, assim como a literatura recente é consensual (Wang et al., 2022; Zhang et al., 2023) incluindo estas plataformas no espectro de "*natural nanocarriers*" ou "*bioinspired nanoparticles*". Adicionalmente, Li et al. (2019) destacam as vesículas extracelulares derivadas de células estaminais como sistemas altamente promissores para a entrega de RNA terapêutico, devido à sua capacidade de comunicação intercelular, biocompatibilidade superior, estabilidade em fluidos biológicos e capacidade para atravessar as barreiras fisiológicas. Estas características posicionam-nas como alternativas naturais altamente eficientes às NP sintéticas tradicionais, principalmente em contextos oncológicos complexos como o CCEO. Assim, a inclusão destas tecnologias é cientificamente válida e coerente com a definição funcional e estrutural de NP aplicadas à oncologia.

# VI. CONCLUSÃO

Esta revisão evidencia de forma abrangente o potencial das NP como sistemas de entrega personalizada de RNA regulatório no tratamento do cancro oral. A diversidade de plataformas exploradas — desde estruturas inorgânicas até sistemas biológicos como exossomas e vesículas extracelulares — reflete a complexidade e o avanço tecnológico no campo da nanomedicina oncológica. A convergência entre engenharia de materiais e biologia molecular tem permitido o desenvolvimento de sistemas altamente específicos, com capacidades não só de entrega eficiente, mas também da modulação activa do microambiente tumoral. A análise dos 28 estudos demonstra que a combinação entre RNA regulatório e NP constitui uma abordagem de precisão com claras vantagens sobre a terapêutica convencional: seletividade aumentada, toxicidade reduzida e potencial para reverter resistência a fármacos. Contudo, persistem desafios relevantes à translação clínica, nomeadamente a replicação do microambiente tumoral em modelos pré-clínicos, a estabilidade e segurança dos sistemas propostos, e a necessidade de desenvolvimento de regulamentação. O futuro da terapia oncológica no CCEO poderá depender do investimento em modelos pré-clínicos mais representativos, da produção em escala clínica e farmacológica de sistemas complexos como exossomas, e da integração de abordagens multi-funcionalizadas que combinem terapias génicas, imunomodulação e quimioterapia seletiva. Esta revisão narrativa oferece assim um contributo crítico para o avanço racional da nanotecnologia aplicada ao cancro oral, com base em evidência robusta e atualizada.

# VII. BIBLIOGRAFIA

Alexander-Bryant, A., Zhang, H., Attaway, C., Pugh, W., Eggart, L., Sansevere, R.,…Jakymiw, A. (2017). Dual peptide-mediated targeted delivery of bioactive siRNAs to oral cancer cells in vivo. Oral Oncology, 72, 123-131. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.07.004

Alexander-Bryant, A. A., Dumitriu, A., Attaway, C. C., Yu, H., & Jakymiw, A. (2015). Sim - Fusogenic-oligoarginine peptide-mediated silencing of the CIP2A oncogene suppresses oral cancer tumor growth in vivo. J Control Release, 218, 72-81. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.026

Bolhassani, A. (2011). Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1816(2), 232-246. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.07.006

Calixto, G. M. F., de Annunzio, S. R., Victorelli, F. D., Frade, M. L., Ferreira, P. S., Chorilli, M., & Fontana, C. R. (2019). Chitosan-Based Drug Delivery Systems for Optimization of Photodynamic Therapy: a Review. AAPS PharmSciTech, 20(7), 253. https://doi.org/10.1208/s12249-019-1407-y

Cao, Y., Tan, Y. F., Wong, Y. S., Liew, M. A.-O., & Venkatraman, S. Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery. LID - 10.3390/md17060381 [doi] LID - 381. (1660-3397 (Electronic)).

Chen, W. H., Lecaros, R. L., Tseng, Y. C., Huang, L., & Hsu, Y. C. (2015). Nanoparticle delivery of HIF1α siRNA combined with photodynamic therapy as a potential treatment strategy for head-and-neck cancer. Cancer Lett, 359(1), 65-74. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.052

Ding, Q. J., Remy, M. T., Upara, C., Hu, J., Mora Mata, A. V., Haes, A. J.,…Hong, L. (2024). sim - CaCO(3) Nanoparticles Delivering MicroRNA-200c Suppress Oral Squamous Cell Carcinoma. J Dent Res, 103(2), 147-155. https://doi.org/10.1177/00220345231216110

Gao, L., Wang, X., Wang, X., Zhang, L., Qiang, C., Chang, S. e.,…Huang, C. (2014). IGF-1R, a target of let-7b, mediates crosstalk between IRS-2/Akt and MAPK pathways to promote proliferation of oral squamous cell carcinoma. Oncotarget; Vol 5, No 9.

Huang, Z., Rui, X., Yi, C., Chen, Y., Chen, R., Liang, Y.,…Xu, X. (2023). Silencing LCN2 suppresses oral squamous cell carcinoma progression by reducing EGFR signal activation and recycling. J Exp Clin Cancer Res, 42(1), 60. https://doi.org/10.1186/s13046-023-02618-z

Juang, V., Chang, C.-H., Wang, C.-S., Wang, H.-E., & Lo, Y.-L. (2019). pH-Responsive PEG-Shedding and Targeting Peptide-Modified Nanoparticles for Dual-Delivery of Irinotecan and microRNA to Enhance Tumor-Specific Therapy. Small, 15(49), 1903296. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.201903296

Kase, Y., Uzawa, K., Wagai, S., Yoshimura, S., Yamamoto, J.-I., Toeda, Y.,…Tanzawa, H. (2021). usar - Engineered exosomes delivering specific tumor-suppressive RNAi attenuate oral cancer progression. Scientific Reports, 11(1), 5897. https://doi.org/10.1038/s41598-021-85242-1

Lecaros, R. L., Huang, L., Lee, T. C., & Hsu, Y. C. (2016). Nanoparticle Delivered VEGF-A siRNA Enhances Photodynamic Therapy for Head and Neck Cancer Treatment. Mol Ther, 24(1), 106-116. https://doi.org/10.1038/mt.2015.169

Li, B., Ding, Y., Huo, C., Ren, S., Chen, S., He, H.,…Li, J. (2024). Targeting Circ-OCAC suppress oral squamous cell carcinoma progression. Oral Dis, 30(4), 2202-2218. https://doi.org/10.1111/odi.14687

Li, L., Lu, S., Liang, X., Cao, B., Wang, S., Jiang, J.,…Zhu, G. (2019). sim - γδTDEs: An Efficient Delivery System for miR-138 with Anti-tumoral and Immunostimulatory Roles

on Oral Squamous Cell Carcinoma. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 14, 101-113. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.11.009

Li, R., Liu, C., Wan, C., Liu, T., Zhang, R., Du, J.,…Li, B. (2023). s/RNA - A Targeted and pH-Responsive Nano-Graphene Oxide Nanoparticle Loaded with Doxorubicin for Synergetic Chemo-Photothermal Therapy of Oral Squamous Cell Carcinoma. Int J Nanomedicine, 18, 3309-3324. https://doi.org/10.2147/ijn.s402249

Liu, J., Huang, Y., Kumar, A., Tan, A., Jin, S., Mozhi, A., & Liang, X.-J. (2014). pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. Biotechnology Advances, 32(4), 693-710. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.009

Liu, P. P., Zhang, Q., Mi, J., Wang, S. S., Xu, Q. P., Zhuang, D. X.,…Wu, X. W. (2022). sim - Exosomes derived from stem cells of human deciduous exfoliated teeth inhibit angiogenesis in vivo and in vitro via the transfer of miR-100-5p and miR-1246. STEM CELL RESEARCH & THERAPY, 13(1), Article 89. https://doi.org/10.1186/s13287-022-02764-9

Lo, Y.-L., Lin, H.-C., & Tseng, W.-H. (2022). SIM - Tumor pH-functionalized and charge-tunable nanoparticles for the nucleus/cytoplasm-directed delivery of oxaliplatin and miRNA in the treatment of head and neck cancer. Acta Biomaterialia, 153, 465-480. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.09.027

Lu, N., Jiang, Q., Xu, T., Gao, Q., Wang, Y., Huang, Z., & Xu, X. (2024). LncOCMRL1 promotes oral squamous cell carcinoma growth and metastasis via the RRM2/EMT pathway. J Exp Clin Cancer Res, 43(1), 267. https://doi.org/10.1186/s13046-024-03190-w

Ma, P., He, M., Lian, H., Li, J., Gao, Y., Wu, J.,…Li, C. (2024). sim - Systemic and Local Administration of a Dual-siRNA Complex Efficiently Inhibits Tumor Growth and Bone Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma. Molecular Pharmaceutics, 21(2), 661-676. https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00802

Ou, L., Sun, T., Liu, M., Zhang, Y., Zhou, Z., Zhan, X.,…Shao, L. (2020). sim - Efficient miRNA Inhibitor Delivery with Graphene Oxide-Polyethylenimine to Inhibit Oral Squamous Cell Carcinoma. Int J Nanomedicine, 15, 1569-1583. https://doi.org/10.2147/ijn.s220057

Remy, M. T., Ding, Q., Krongbaramee, T., Hu, J., Mora Mata, A. V., Haes, A. J.,…Hong, L. (2022). Plasmid encoding miRNA-200c delivered by CaCO(3)-based nanoparticles enhances rat alveolar bone formation. Nanomedicine (Lond), 17(19), 1339-1354. https://doi.org/10.2217/nnm-2022-0151

Santos-Carballal, B., Fernández Fernández, E., & Goycoolea, F. M. (2018). Chitosan in Non-Viral Gene Delivery: Role of Structure, Characterization Methods, and Insights in Cancer and Rare Diseases Therapies. Polymers (Basel), 10(4). https://doi.org/10.3390/polym10040444

Sayyed, A. A., Gondaliya, P., Mali, M., Pawar, A., Bhat, P., Khairnar, A.,…Kalia, K. (2021). sim - MiR-155 Inhibitor-Laden Exosomes Reverse Resistance to Cisplatin in a 3D Tumor Spheroid and Xenograft Model of Oral Cancer. Mol Pharm, 18(8), 3010-3025. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00213

Shi, S., Wang, Y., Wang, B., Chen, Q., Wan, G., Yang, X.,…Wang, Y. (2020). tongue - Homologous-targeting biomimetic nanoparticles for photothermal therapy and Nrf2-siRNA amplified photodynamic therapy against oral tongue squamous cell carcinoma. Chemical Engineering Journal, 388, 124268.

Wang, B. K., Yu, X. F., Wang, J. H., Li, Z. B., Li, P. H., Wang, H.,…Li, C. (2016). Gold-nanorods-siRNA nanoplex for improved photothermal therapy by gene silencing. Biomaterials, 78, 27-39. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.025

Wang, D., Xu, X., Zhang, K., Sun, B., Wang, L., Meng, L.,…Sun, H. (2018). Codelivery of doxorubicin and MDR1-siRNA by mesoporous silica nanoparticles-

polymerpolyethylenimine to improve oral squamous carcinoma treatment. Int J Nanomedicine, 13, 187-198. https://doi.org/10.2147/ijn.s150610

Wang, J., Wang, K., Liang, J., Jin, J., Wang, X., & Yan, S. (2021). Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles-mediated co-delivery of MTHFD1L shRNA and 5-aminolevulinic acid for combination photodynamic-gene therapy in oral cancer. Photodiagnosis Photodyn Ther, 36, 102581. https://doi.org/10.1016/j.pdTFD.2021.102581

Wang, X., Li, S., & Liu, H. (2021). apagar s/RNA - Co-delivery of chitosan nanoparticles of 5-aminolevulinic acid and shGBAS for improving photodynamic therapy efficacy in oral squamous cell carcinomas. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 34, 102218. https://doi.org/10.1016/j.pdTFD.2021.102218

Wu, Y.-Y., Chen, Y.-L., Jao, Y.-C., Hsieh, I. S., Chang, K.-C., & Hong, T.-M. (2014). miR-320 regulates tumor angiogenesis driven by vascular endothelial cells in oral cancer by silencing neuropilin 1. Angiogenesis, 17(1), 247-260. https://doi.org/10.1007/s10456-013-9394-1

Xie, C., Du, L. Y., Guo, F., Li, X., & Cheng, B. (2019). sim usar - Exosomes derived from microRNA-101-3p-overexpressing human bone marrow mesenchymal stem cells suppress oral cancer cell proliferation, invasion, and migration. Mol Cell Biochem, 458(1-2), 11-26. https://doi.org/10.1007/s11010-019-03526-7

Xu, G., Song, X., Wang, X., Xue, R., Yan, X., Qin, L.,…Song, G. (2024). Combined miR-181a-5p and Ag Nanoparticles are Effective Against Oral Cancer in a Mouse Model. Int J Nanomedicine, 19, 9227-9253. https://doi.org/10.2147/ijn.s458484

Xu, S., Qin, X., Liang, J., Fu, X., Xiao, D., Lin, Y., & Wang, T. (2024). Sim - Harnessing tetrahedral framework nucleic acids for enhanced delivery of microRNA-149-3p: A new frontier in oral squamous cell carcinoma therapy. Cell Proliferation, 57(8), e13637. https://doi.org/ttps://doi.org/ 10.1111/cpr.13637

Yang, H., Chen, W., Tan, Z., Lin, J., Liu, Z., Ji, F.,…Cao, M. (2024). Sim - Let-7b miRNA-loaded nanostructures inhibited human tongue squamous cell carcinoma metastasis by the MOR-SRC-EGFR axis. Current Research in Biotechnology, 7, 100213. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2024.100213

Yang, H., Zhang, Y., Tan, Z., Liu, Z., Yan, Y., Li, Q.,…Ji, F. (2024). Nucleus-targeted Silencer nanoplatform regulating ZEB1-AS1 in head and neck squamous cell carcinoma therapy. Discov Nano, 19(1), 192. https://doi.org/10.1186/s11671-024-04148-9

Yeh, C.-H., Chen, J., Zheng, G., Huang, L., & Hsu, Y.-C. (2021). usar - Novel pyropheophorbide phosphatydic acids photosensitizer combined EGFR siRNA gene therapy for head and neck cancer treatment (tongue). Pharmaceutics, 13(9), 1435.

Zhou, J. Y., Wang, W. J., Zhang, C. Y., Ling, Y. Y., Hong, X. J., Su, Q.,…Wu, T. (2022). Ru(II)-modified TiO(2) nanoparticles for hypoxia-adaptive photo-immunotherapy of oral squamous cell carcinoma. Biomaterials, 289, 121757. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121757

Zhu, W., Wang, J., Liu, X., Xu, Y., Zhai, R., Zhang, J.,…Liu, L. (2022). Sim - lncRNA CYTOR promotes aberrant glycolysis and mitochondrial respiration via HNRNPC-mediated ZEB1 stabilization in oral squamous cell carcinoma. Cell death & disease, 13(8), 703. https://doi.org/10.1038/s41419-022-05157-1