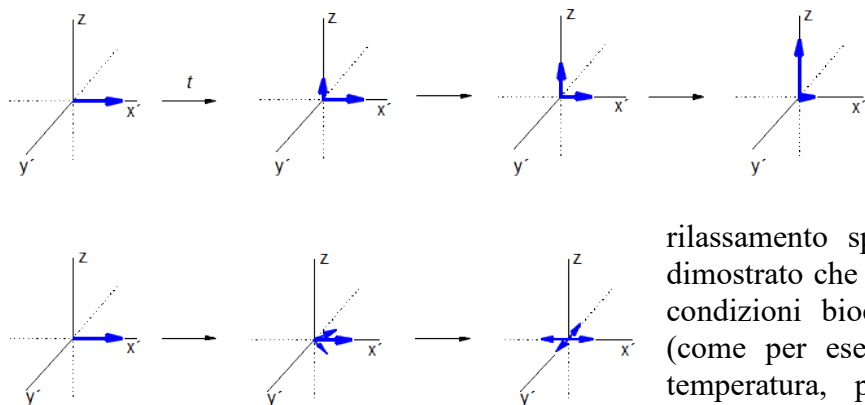


Tomografia di risonanza magnetica (MRI)

Negli ultimi 30 anni la tomografia di risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI) ha assunto una crescente importanza come metodo diagnostico di immagine che riesce a fornire risoluzione spaziale e contrasto superbi. Il maggiore vantaggio dell'MRI rispetto agli altri metodi radiodiagnostici come CT, SPECT o PET è senza dubbio l'assenza di dannose radiazioni ad elevata energia. Il maggior limite per la tecnica MRI, come vedremo ampiamente dopo, è la **bassa sensibilità**. La tecnica MRI si basa sul monitoraggio della distribuzione e delle differenti proprietà delle molecole d'acqua nei tessuti tramite la misura della variazione nello spazio del **tempo di rilassamento** degli **spin nucleari dei protoni dell'acqua**. In particolare si può seguire il **rilassamento longitudinale**



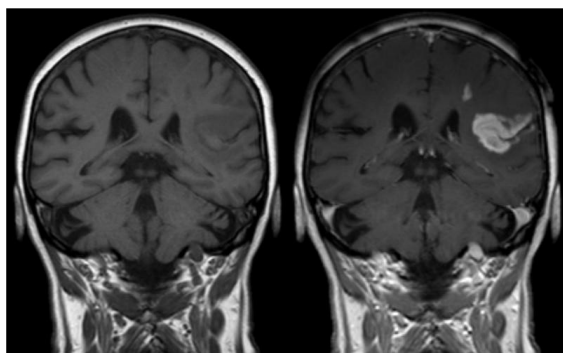
(T_1), cioè lungo le linee del campo magnetico applicato (detto anche rilassamento spin-reticolo, o *spin-lattice*, figura sopra) e/o di quello **trasversale** (T_2) (detto anche

rilassamento spin-spin, figura sotto) E' stato dimostrato che T_1 e T_2 sono molto sensibili alle condizioni biochimiche del tessuto in esame (come per esempio concentrazione di acqua, temperatura, pH, concentrazione di sali o grassi,...); di conseguenza uno scanner MRI,

confrontando questi parametri tra le parti sane e quelle che hanno subito delle variazioni patologiche in uno stesso tessuto, è in grado di fornire un ottimo **contrasto**. Il contrasto a livello dei tessuti molli è molto buono e l'MRI fornisce rapidamente **informazioni anatomiche**. Oltre che per stabilire variazioni di tipo anatomico, l'MRI può essere utilizzato per monitorare la funzionalità di organi, per esempio è stata utilizzata per seguire le funzioni del cervello umano in tempo reale. Al momento, la risoluzione raggiunta dai moderni strumenti MRI ospedalieri è sub-millimetrica, ma in laboratorio è già stata raggiunta una **risoluzione a livello cellulare**. Di conseguenza, il futuro potenziale dell'MRI come tecnica diagnostica è ancora enorme. Inoltre, le sequenze di impulsi, oltre a poter essere "pesate" secondo i tempi di rilassamento T_1 o secondo T_2 , possono essere variate in modo da evidenziare, ad esempio, le differenze fra tessuti che hanno diversa densità di protoni, differenti velocità di diffusione dell'acqua, oppure differenti *chemical shifts* (e.g. acqua rispetto a lipidi).

Tuttavia si è osservato che per certi organi o tessuti, come il tratto gastro-intestinale o il cervello, le informazioni diagnostiche ottenute con una semplice immagine MRI non sono sufficienti. In questi casi diventa necessaria la somministrazione di un opportuno **agente di contrasto** (*contrast agent*, CA). I migliori CA sono composti contenenti **ioni paramagnetici**.

Dal punto di vista fisico, vi sono due classi di agenti di contrasto, classificati secondo il processo di rilassamento di spin nucleare che essi **accelerano** (in prevalenza), cioè i T_1 -CA (paramagnetici) e i T_2 -CA (super-paramagnetici). Mentre i T_1 -CA inducono un contrasto positivo, cioè fanno aumentare



i segnali ^1H NMR del tessuto interessato (il tessuto con il tempo di rilassamento T_1 accorciato diventa iperintenso, cioè più chiaro), i composti che accelerano il tempo di rilassamento trasversale inducono una diminuzione dei segnali dei protoni e quindi un contrasto negativo (il tessuto diventa più scuro). Il tempo di rilassamento longitudinale T_1 dei protoni dell'acqua in soluzioni diamagnetiche è tipicamente circa 5 volte più grande (cioè più lungo) di quello trasversale (T_2) e quindi è più facile da accorciare.

Storicamente, quindi, i T_1 -CA sono stati studiati più estesamente; dal punto di vista chimico essi sono complessi di ioni metallici paramagnetici con **tanti elettroni spaiati** come Fe(III), Mn(II) e Gd(III)

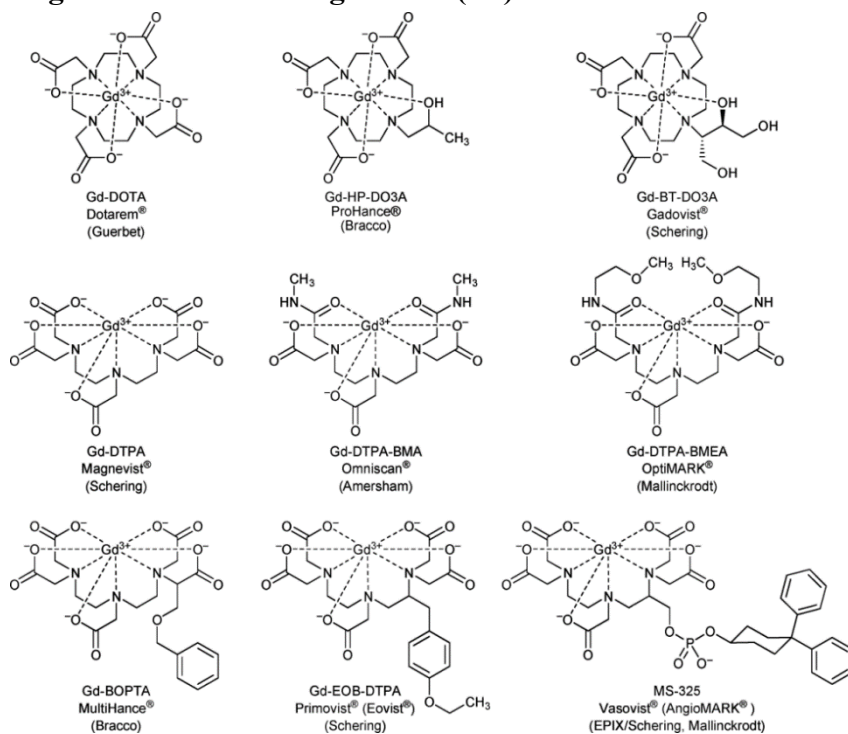
con opportuni chelanti organici. I T_2 -CA (che in realtà influenzano anche il T_1) sono stati sviluppati in un periodo più recente e consistono di nanoparticelle microcristalline di ossidi di ferro, anche chiamate *Small Superparamagnetic Iron Oxides* (SPIO) o *Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides* (USPIO) (vedi anche la terapia magnetotermica). In pratica essi sono fatti da NP di Fe_3O_4/Fe_2O_3 di composizione non-stechiometrica e di dimensioni da alcuni nanometri a parecchie decine di nanometri, coperte da polimeri biocompatibili (e.g. destrani o polisilossani) per rallentarne la decomposizione. La figura mostra un'immagine ("pesata" in T_1) di un cervello dopo un ictus; si vede che solo la presenza di un agente di contrasto (a destra) riesce ad evidenziare chiaramente un danno nella barriera emato-encefalica.

Inoltre, tutti i CA possono venire suddivisi in base al loro sito di azione in **agenti extracellulari non-specifici, organo-specifici e del sangue**.

Da sottolineare che gli agenti di contrasto attualmente in uso clinico si distribuiscono passivamente nell'organismo, senza dare praticamente alcuna interazione con le proteine o le cellule del paziente. Il segnale che si osserva è strettamente correlato alla distribuzione dell'agente di contrasto. Così gli agenti di contrasto extracellulari sono in grado di dare un eccellente contrasto per differenziare strutture anatomiche o per caratterizzare fisiopatologie, ma lo fanno in modo non-specifico. Dal momento che la concentrazione dei protoni dell'acqua contenuta nei tessuti è molto elevata (ca. 90 M), l'effetto dei CA deve essere di tipo **catalitico**, cioè deve essere amplificato, ossia ogni CA deve rilassare i protoni di moltissime molecole d'acqua. Se fosse direttamente proporzionale alla concentrazione del CA, come per i radio-farmaci, non si potrebbe vedere alcun effetto.

Nella pratica clinica, si valuta che nei soli USA vengono effettuati più di 30 milioni di *scan* MRI ogni anno. Più del 40% degli esami MRI (cioè parecchi milioni al mondo ogni anno) vengono effettuati con l'uso di un agente di contrasto. I CA più utilizzati in clinica sono i T_1 -CA basati su complessi di Gd(III) ed essi verranno trattati più in dettaglio (dati del 2019 indicavano che venissero usate più di 50 tonnellate di Gd all'anno per questo scopo). L'uso di nanoparticelle di ossidi di ferro è piuttosto limitato, si valuta meno del 10% di tutte le somministrazioni di agenti di contrasto.

Agenti di contrasto di gadolinio(III)



In un buon agente di contrasto basato su un catione metallico paramagnetico, il tempo di rilassamento intrinseco dello stato di **spin elettronico del catione** deve essere abbastanza lungo per permettere l'efficiente trasferimento dell'informazione magnetica agli **spin nucleari degli idrogeni dell'acqua di bulk**. Quindi, sebbene vi siano anche altri candidati nella serie dei lantanidi che hanno un elevato momento magnetico intrinseco (cioè tanti elettroni spaiati), la posizione (attualmente) prevalente del Gd(III) è dovuta **non solo** al fatto che esso possiede un elevato momento magnetico intrinseco (7.9 BM)

dovuto ai 7 elettroni spaiati di tipo f, ma anche al fatto che il suo stato di spin elettronico è totalmente simmetrico (un termine di *ground state* $^8S_{7/2}$), in conseguenza del quale il suo **tempo di rilassamento elettronico** in presenza di un campo magnetico esterno è molto più lungo che per gli altri ioni lantanidici Ln(III), dell'ordine $10^{-8} - 10^{-9}$ s. Da notare che, sebbene i CA a base di Gd(III) diminuiscano sia il tempo di rilassamento longitudinale che quello trasversale, la variazione percentuale nel tessuto per la velocità di rilassamento longitudinale è molto maggiore e di conseguenza questi agenti si visualizzano meglio con *scan* "pesati" su T_1 (T_1 -weighted scans). Comunque, il maggior problema per l'applicazione medica di ioni di metalli pesanti come il Gd(III) è la notevole tossicità dello ione libero, cioè l'aquo-ione ($LD_{50} = 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ nel topo).

Quindi, per l'uso clinico, il Gd(III) deve essere legato all'interno di un complesso di elevata stabilità sia termodinamica che cinetica nei confronti di reazioni di trans-chelazione e trans-metallazione (come per i radionuclidi): cioè lo ione gadolinio non deve venire scambiato con altri chelanti biologici né venir sostituito da altri ioni metallici biologici, come Zn^{2+} o Ca^{2+} . Per questo scopo, cioè per ottenere complessi stabili e inerti, sono stati sviluppati sostanzialmente due tipi di chelanti organici, gli stessi già incontrati nei radiofarmaci: derivati del tetra-aza macrociclo a 12 membri cyclen (cyclen = 1,4,7,10-tetraazaciclododecano) e derivati di triammine acicliche (in particolare della dietilene-triammina) con molti bracci chelanti (soprattutto con funzioni carbossiliche), noti rispettivamente come derivati di tipo **DOTA** e **DTPA**, in modo tale da fornire una coordinazione ottadentata allo ione Gd(III). Ricordiamo che i lantanidi sono ioni grandi e di natura *hard* e hanno numeri di coordinazione elevati, tipicamente almeno 8 o 9. In questi complessi il numero di coordinazione del Gd(III) è 9, con l'ultimo sito occupato da una molecola di H_2O che è cruciale per il meccanismo di contrasto (vedi dopo). Nonostante l'elevatissima stabilità di questi complessi, in anni recenti si è evidenziato che trattamenti prolungati con CA di gadolinio inducono tossicità renale (*nephrogenic systemic fibrosis*), soprattutto in pazienti già affetti da problemi renali.

In figura vengono mostrati i 9 complessi di Gd(III) usati clinicamente al momento; fra di essi i primi 6 hanno applicazioni generiche, cioè sono dei cosiddetti **agenti extracellulari non-specifici (ECA)**. In seguito a iniezione intravenosa questi composti si distribuiscono rapidamente tra plasma e spazi interstiziali (cioè nel fluido extra-cellulare) e sono infine eliminati con l'urina con tempi di semi-vita di circa 1.6 h. Da notare che l'effetto dei CA è immediato (al contrario di molti agenti SPECT e PET), cioè gli scan si registrano pochi minuti dopo la somministrazione. Tipicamente una patologia viene

individuata per via di **variazioni anatomiche** (e.g. arterie più strette) oppure **fisiologiche** (e.g. barriera ematoencefalica permeabile, *leaky*). Essi possono essere ideali per identificare tessuti patologici. Per esempio, i tumori sono tipicamente caratterizzati da iper-vascularizzazione, endotelio danneggiato, e/o da un sistema di drenaggio linfatico insufficiente, così trattengono temporaneamente concentrazioni più elevate (e per tempi più lunghi) dell'agente di contrasto rispetto al tessuto sano, permettendo di individuare la lesione. Nelle malattie neurologiche, questi CA sono particolarmente utili per individuare lesioni risultanti dal danneggiamento della barriera emato-encefalica.

Invece MultiHance[®] e Primovist[®] sono specifici per il fegato (essendo più lipofili) e Vasovist[®] per il flusso sanguigno (CA angiografico). Quest'ultimo, anche in seguito al legame con l'albumina (vedi dopo), rimane intravascolare, consentendo di ottenere un'immagine dei vasi sanguigni. La figura

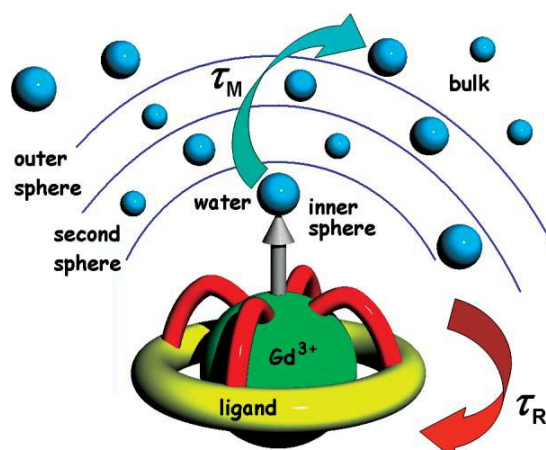


mostra la differenza fra il pre-contrasto (a sinistra), il contrasto ottenuto con un CA extracellulare (al centro) e con uno angiografico (a destra). Le dosi possono essere di poche micromoli per kg (per Primovist[®]), ma molto più comunemente sono dell'ordine di 0.1 –

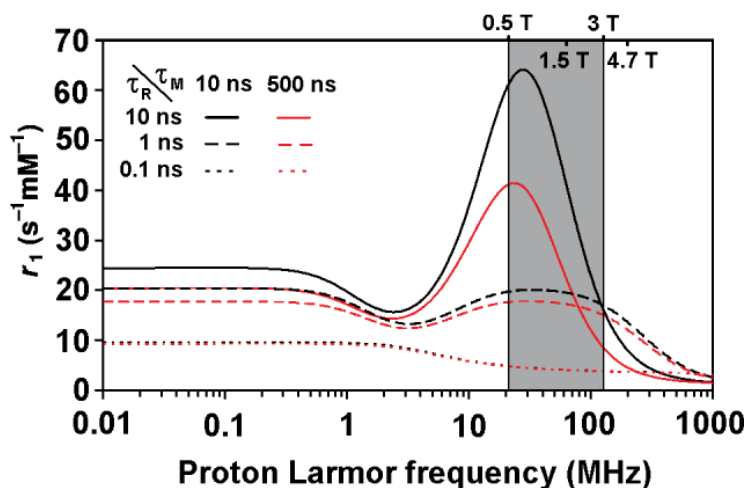
0.3 millimoli per kg, cioè si somministrano grammi di composto di Gd per ogni scan, ossia quantità molto più grandi di quelle utilizzate per i radio-farmaci. In altre parole, come già detto, la tecnica MRI è molto meno sensibile di SPECT e PET.

L'efficacia di un agente di contrasto è misurata come la capacità di una sua soluzione 1 mM di **umentare** la velocità di rilassamento longitudinale R_1 ($= 1/T_1$) dei protoni dell'acqua (quindi è un **effetto indiretto**, al contrario dei radiodiagnostici) ed è chiamata **relattività** (*relaxivity*, r_1). Secondo la **teoria di Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM Theory)**, la relattività è governata da un numero di parametri chimico-fisici, caratteristici della struttura del complesso e della sua dinamica in soluzione. Quelli che possono essere controllati chimicamente (figura) sono ovviamente di primaria importanza nel *design* dei leganti. Essi sono: 1) il numero di molecole di acqua direttamente coordinate al Gd(III) (q , molecole di acqua di sfera interna); infatti il Gd^{3+} induce il rilassamento dei protoni dell'acqua tramite un meccanismo dipolare e l'effetto dipende dalla distanza tra i nuclei secondo $1/r^6$ e perciò è fondamentale che ci siano una o più molecole di acqua labili, cioè scambiabili con quelle di *bulk*, nella sfera di coordinazione interna.

2) il tempo di residenza delle molecole di acqua coordinate (τ_M); tanto più questo è piccolo e tanto più rapidamente il rilassamento viene trasferito tramite la molecola coordinata all'acqua di *bulk*. 3) il tempo di correlazione rotazionale, il cosiddetto *tumbling time* molecolare del complesso (τ_R). 4) Le interazioni del complesso con le molecole di acqua nella seconda sfera di coordinazione e con quelle più esterne (il numero di idratazione q_{SS} e il tempo medio di residenza τ_{MSS}); 5) parametri elettronici, cioè essenzialmente il tempo di rilassamento dello spin elettronico dello ione paramagnetico; questo deve essere il più lungo possibile per rilassare in modo più efficiente l'acqua coordinata. In molecole con *tumbling* veloce, questo parametro è più importante di τ_M per determinare la relattività.



Questi parametri possono essere valutati e misurati indipendentemente. Valori tipici di tali parametri per T_1 -CA usati in clinica sono: una molecola di acqua coordinata, più di 100 ns per τ_M e 0.1 ns per τ_R . **Valori ottimali** per un campo magnetico di 1.5 T (che è quello più comunemente usato negli attuali scanner per MRI, ma gli strumenti moderni si spostano rapidamente verso 3T per aumentare sensibilità e risoluzione) dovrebbero essere circa 10 ns per τ_M (cioè le molecole d'acqua nella sfera interna dovrebbero scambiare più rapidamente con l'acqua di *bulk*) e almeno 10 ns per τ_R (cioè il



moto di rotazione della molecola dovrebbe essere più lento). La discrepanza fra valori reali ed ottimali comporta che la rilassività di questi complessi sia piuttosto bassa, tipicamente dell'ordine di $5 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$, mentre secondo il modello della teoria SBM dovrebbe essere teoricamente possibile ottenere valori anche 20 volte superiori, ottimizzando tutti i parametri attraverso il *design* del legante (figura). La figura mostra le simulazioni calcolate dei profili di rilassività in funzione di diversi valori di τ_R e del tempo di residenza dell'acqua

τ_M per valori fissi dei parametri elettronici. È chiaro che ogni campo magnetico richiede valori ottimali diversi di τ_R e τ_M e che la massima rilassività può essere ottenuta – per campi magnetici da 0.24 a 1.65 T (corrispondenti alla frequenza di Larmor del protone di 10 – 70 MHz) per valori di τ_R più alti possibile e valori di τ_M nel range 10 – 50 ns. Per campi magnetici più elevati (100–400 MHz per la frequenza di Larmor) la situazione cambia e sono preferibili valori ancora più piccoli di τ_M , e τ_R dovrebbe avere un valore intermedio. In pratica, CA adatti per campi magnetici elevati dovrebbero avere pesi molecolari (e quindi dimensioni, cioè τ_R) intermedi e velocità di scambio dell'acqua molto elevata. Ovviamente, un aumento dell'efficacia del complesso, cioè del suo valore di r_1 , consentirebbe di diminuire le dosi somministrate.

Negli ultimi 20 anni vi è quindi stata una intensa attività di ricerca per migliorare le proprietà del legante; in particolare la struttura del complesso deve essere modificata in modo tale da aumentare la velocità di scambio dell'acqua coordinata di 10 volte e da aumentare il *tumbling time* (cioè diminuire la velocità di rotazione molecolare) di due ordini di grandezza. Si è visto che effettivamente alcuni dei parametri citati sopra (in particolare q , τ_M e τ_R e la seconda sfera di idratazione) possono venire modificati su una base chimica tramite opportuno *design* del legante. Altri parametri fisici presenti nella teoria SBM, come il rilassamento elettronico del Gd(III) (punto 5 sopra), sebbene dipendano intrinsecamente dalla struttura del complesso, sono (per ora) difficilmente prevedibili e modificabili razionalmente. In generale, si può dire che un rilassamento elettronico troppo veloce porta ad una significativa riduzione della rilassività complessiva. Sembra che una disposizione altamente simmetrica degli atomi donatori del chelante fornisca complessi di Gd(III) con tempi di rilassamento elettronico più elevati (e quindi preferibili).

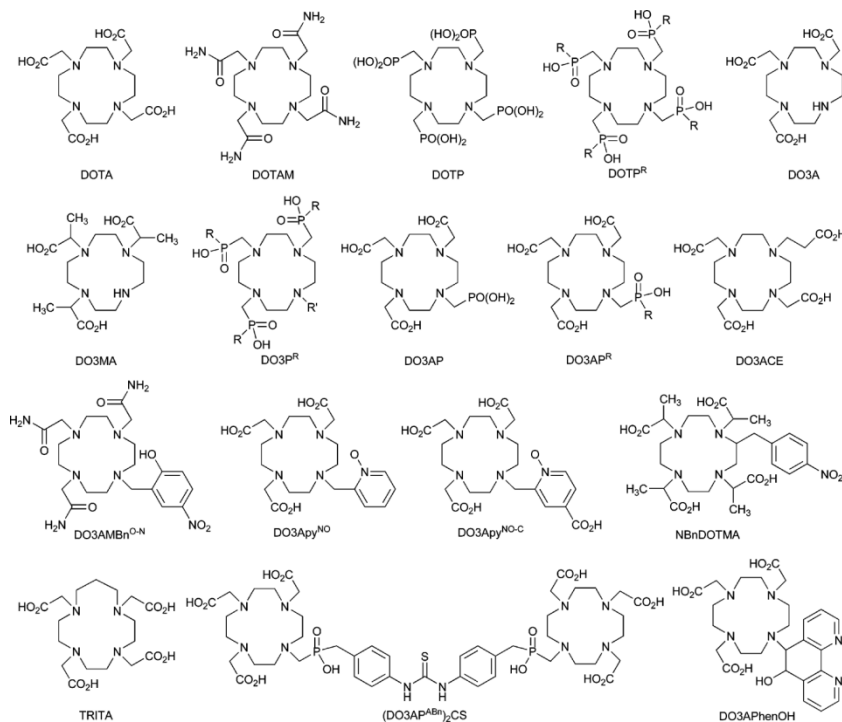
Infine, vi è naturalmente il problema della localizzazione degli agenti di contrasto nell'organo o tessuto bersaglio. Gli agenti di contrasto per MRI vengono comunemente trasportati nel corpo dal sistema vascolare, ma l'interesse medico è focalizzato su particolari organi o tessuti e sulla loro funzionalità; quindi si è cercato di modificare le caratteristiche strutturali di DOTA e DTPA non solo per modificare i parametri citati sopra, ma anche per cercare di ottenere **selettività di organo e/o di tessuto** e anche per renderli sensibili a variazioni chimico-fisiche nel loro micro-ambiente, come pH, concentrazione di O_2 , concentrazione di ioni, temperatura, attività enzimatica (questi ultimi vengono definiti anche *Responsive Contrast Agents*, **RCA**). Alcuni **RCA** vengono utilizzati anche in ricerca preclinica e nello studio di processi di biologia molecolare (ad esempio RCA che cambiano la

relattività in seguito alla rottura di alcuni specifici legami chimici o che siano sensibili alla presenza di ioni o metaboliti specifici).

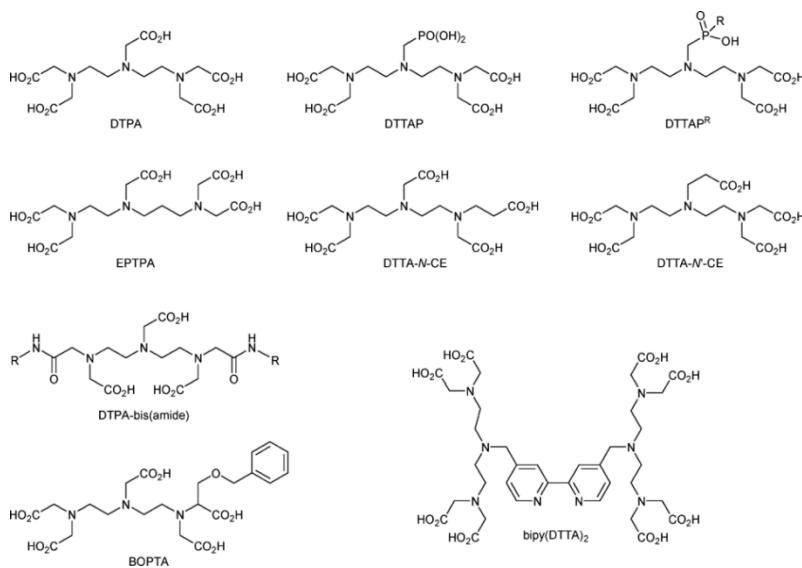
Leganti per MRI

Con lo scopo di ottenere agenti di contrasto più efficaci, sono stati investigati molti leganti derivati dal DOTA (DOTA-like) e da DTPA (DTPA-like).

Il prototipo DOTA si lega come tetra-anione al Gd(III); i 4 atomi N ed i 4 atomi O formano due piani paralleli e sfalsati nella sfera di coordinazione, a dare una geometria di antiprisma quadrato; il piano O_4 è sormontato dalla molecola di acqua coordinata. Sono possibili 4 diastereoisomeri a causa della conformazione (λ o δ) dei gruppi etilenici del macrociclo e dell'orientazione Λ o Δ dei bracci acetato. Una serie di leganti DOTA-like è riportata in figura. Sono state saggiate funzionalità diverse dai carbossilati nei bracci laterali. Il



DO3A e suoi derivati, che hanno soltanto tre bracci laterali, sono chelanti eptadentati, quindi i loro derivati hanno due molecole di acqua nella sfera di coordinazione interna, e quindi dovrebbero aumentare la relattività (a scapito della stabilità termodinamica e cinetica del chelato). Tuttavia le due molecole d'acqua coordinate sono presenti solo in soluzioni acquose pure e diluite, mentre *in vivo* vengono sostituite da bioliganti anionici chelanti come carbonato, citrato, aminoacidi,... annullando il potenziale aspetto positivo.

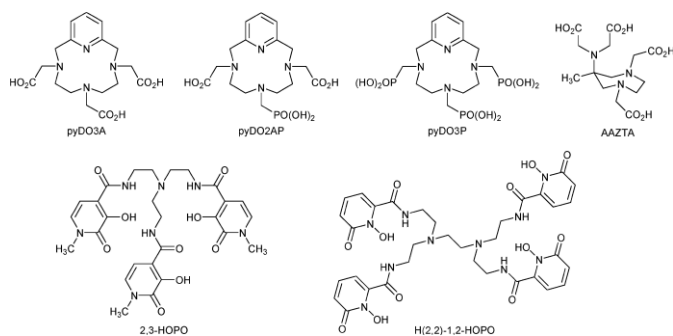


Anche derivati del DTPA possono fornire una coordinazione eptadentata, quando il carbossile del braccio sull'azoto centrale della dietilentriammina è rimpiazzato da un sostituito che non coordini al Gd(III) (ad esempio bipy(DTTA)₂ in figura).

Dal momento che i CA passano attraverso i reni, dove il pH è acido (può raggiungere valori intorno a 4.5) è importante che essi presentino una *long-term stability* (sia termodinamica che cinetica) a questi valori relativamente bassi di pH. In generale, dal punto di vista cinetico i complessi con leganti macrociclici tipo DOTA sono più inerti di quelli con leganti aperti tipo DTPA (e quindi sono potenzialmente meno tossici).

Recentemente sono stati introdotti nuovi prototipi di leganti eptadentati (come il legante mesociclico AAZTA e derivati), e altri basati su unità idrossipiridinone (HOPO) legate a scheletri poliamminici, e.g. tren (figura). Il 2,3-HOPO, pur essendo esadentato, ha una costante di formazione molto alta

(vedi dopo), probabilmente perché ha solo atomi donatori di O e viene così meglio incontro alle preferenze dello ione *hard* Gd^{3+} . Il complesso è complessivamente ottacoordinato, con $q = 2$, con una rilassività di $10.5 \text{ mm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, cioè praticamente doppia rispetto a quella degli agenti utilizzati clinicamente. Il complesso tuttavia, essendo neutro, non è molto solubile. Come è facilmente immaginabile, è in atto un gran lavoro di ricerca volto a funzionalizzare e migliorare la struttura di base e sono stati sintetizzati molti leganti tipo-HOPO i cui complessi col gadolinio spesso presentano buona stabilità e proprietà rilassometriche migliori rispetto a quelli con derivati di DOTA e DTPA.



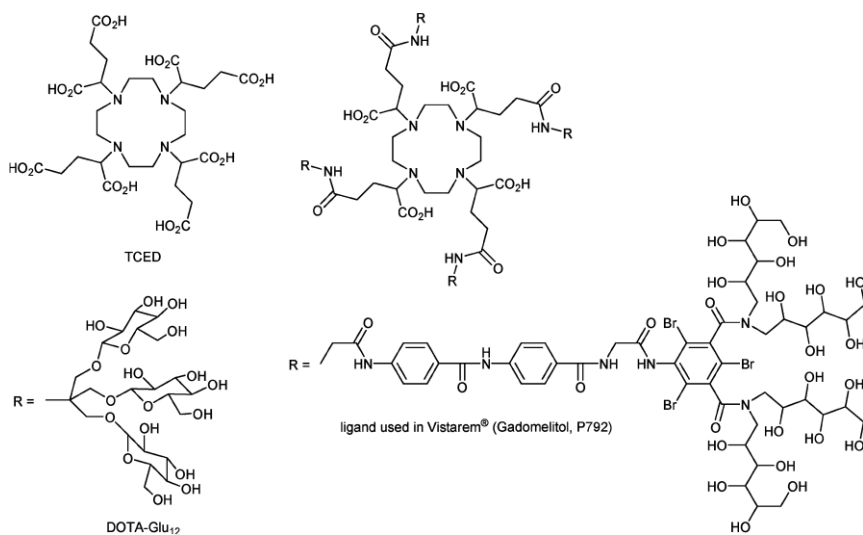
La stabilità termodinamica dei complessi di Gd con leganti otta- ed epta dentati (L) capostipiti tipo DOTA, DTPA e DO3A, misurata come $\log K_{GdL}$ è molto elevata, e aumenta nell'ordine DO3A ($\log K_{GdL} \sim 21$) < DTPA (~ 22) < DOTA (~ 24). Modifiche dei leganti nelle catene laterali fanno variare le costanti a seconda della natura dei gruppi introdotti. Le costanti di stabilità del complesso $[Gd(AAZTA)(H_2O)_2]$ ($\log K_{GdL} = 19.3$) e dei complessi di Gd(III) con

leganti tipo HOPO ($\log K_{GdL} = 18-21$) sono confrontabili. Ma molto più importante della stabilità termodinamica è l'inerzia cinetica dei complessi nei riguardi delle reazioni di sostituzione con altri chelanti e/o ioni metallici presenti nell'organismo. Particolarmente studiate, per valutare la stabilità cinetica, sono le reazioni di trans-metallazione (e.g. sostituzione del Gd^{3+} con Zn^{2+}) e la de-complezione in condizioni acide (per mimare la situazione nei reni). In genere, si può dire che i leganti macrociclici tipo-DOTA formano complessi più stabili anche dal punto di vista cinetico (anche a pH leggermente acido) rispetto a quelli a catena aperta.

Design dei complessi e parametri che influenzano la rilassività

Per ottenere un agente con elevata rilassività e di uso pratico si deve idealmente realizzare la massimizzazione di ciascun parametro rilevante e la loro combinazione ottimale, mantenendo la stabilità del chelato e la solubilità. In generale si può dire che, con i chelanti visti sopra, il metallo è circondato dal chelante polidentato (i complessi sono tutti termodinamicamente molto stabili: quello "meno" stabile fra i 9 composti utilizzati clinicamente, Gd-DTPA-BMA, ha un $pGd = 15.8$.) e il numero di molecole di acqua coordinate dipende non solo dal numero di atomi donatori, ma anche dalla dimensione dei gruppi donatori e dalla geometria del poliedro di coordinazione. Come già detto, chelanti epta- o esa-dentati favoriscono in teoria la coordinazione di più molecole di acqua, ma in realtà i loro complessi formano facilmente dimeri o polimeri e le molecole d'acqua sono facilmente

sostituite da piccoli bio-leganti (il che porta al *quenching* della rilassività del complesso). In teoria, la rilassività di un complesso con 2 molecole di acqua nella sfera interna dovrebbe essere il doppio di quella di complessi con una sola molecola coordinata. La formazione di addotti ternari con piccoli anioni in soluzione è soppressa quando il complesso abbia una carica negativa. Al momento i complessi di Gd(III) con

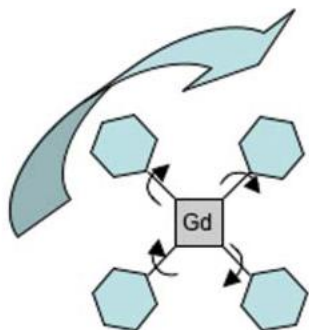


AAZTA e HOPO hanno sicuramente 2 molecole di acqua coordinate e la loro rilassività non è molto

influenzata dalla presenza in soluzione di piccoli leganti. Tuttavia non ci sono ancora sufficienti dati sulla stabilità cinetica (estremamente importante per la tossicità) di questi complessi.

Un altro parametro importante per la rilassività di un complesso è τ_M , il tempo di permanenza nella sfera di coordinazione della molecola di acqua coordinata al gadolinio. Il tempo di residenza dovrebbe essere ragionevolmente corto per aumentare la rilassività; valori di 10–30 ns sono ideali per campi di 1.5 T (cioè 60 MHz). Tuttavia, per i magneti più potenti che diventeranno commerciali nei prossimi anni (fino a 11.7 T corrispondenti a 500 MHz) saranno necessari τ_M più brevi, 1 – 10 ns, possibilmente vicini a quelli di scambio dell'acqua in $[\text{Gd}(\text{OH}_2)_8]^{3+}$ (1.2 ns). Il valore di τ_M dipende essenzialmente dalla carica del complesso, dalla accessibilità del solvente, dai parametri sterici intorno al sito di coordinazione dell'acqua (quindi dalla struttura e conformazione del complesso), e dal meccanismo di scambio dell'acqua (dissociativo o associativo). Complessi con carica negativa hanno tempi molto più brevi (50 – 300 ns) rispetto a quelli dei complessi neutri o carichi positivamente (che hanno τ_M che possono arrivare a millisecondi). In genere, la presenza di sostituenti ingombranti intorno al sito di coordinazione accelera la velocità di scambio dell'acqua; inoltre è preferibile una certa flessibilità nella geometria della sfera di coordinazione. Per i derivati tipo DOTA, il valore di τ_M dipende anche dallo stereoisomero prevalente in soluzione. In generale, il valore di τ_M non influenza in modo significativo la rilassività dei CA con basso peso molecolare (cioè con valori di *tumbling time* piccoli), tuttavia questo parametro deve venire ottimizzato per CA che abbiano un movimento di *tumbling* lento, cioè τ_R grande (vedi dopo).

Per quanto riguarda i parametri della seconda sfera di coordinazione, q_{SS} e τ_{MSS} , il tempo di residenza delle molecole di acqua τ_{MSS} è molto più corto di τ_M (teoricamente dell'ordine di picosecondi). Il contributo di questi parametri alla rilassività complessiva può essere rilevante, e in certi casi superare addirittura il contributo della prima sfera di coordinazione. La strategia è quella di avere dei gruppi periferici, tipo acidi fosfonici o –OH, in grado di dare legami a idrogeno con le molecole di acqua e quindi aumentarne il numero. Ad esempio, il legante DOTA-like denominato TCED (figura prima) è

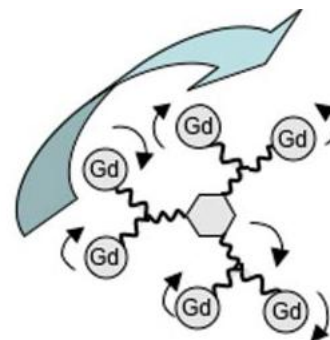


stato funzionalizzato con catene laterali ricche di gruppi –OH. Il derivato con le funzioni polisaccaridiche Vistarem® (oltre ad aumentare τ_R , vedi dopo) aumenta anche la seconda sfera di molecole di H_2O arrivando a una rilassività di circa $23 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

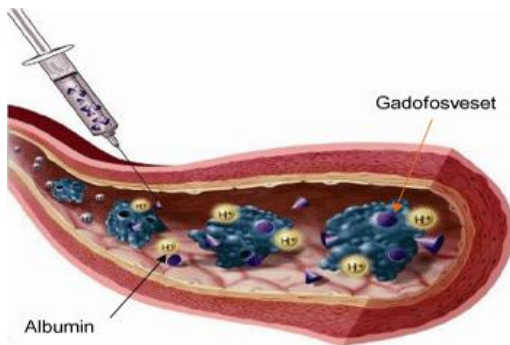
Come già detto, il tempo di correlazione rotazionale τ_R (*tumbling time*) è un parametro fondamentale. Si può dire che nei sistemi in cui questo parametro è stato ottimizzato, l'intera rilassività è controllata dal tempo di correlazione rotazionale. Per rallentare i movimenti di riorientazione dei complessi di gadolinio (cioè aumentare τ_R) sono state usate diverse strategie. In genere un aumento di τ_R è conseguenza di un aumento del

volume molecolare del complesso. Ad esempio, una strategia elegante per aumentare τ_R consiste nel posizionare il Gd(III) nel baricentro della molecola, così che il *tumbling time* molecolare venga trasferito efficacemente alla rotazione del vettore del legame Gd–OH₂, cioè il Gd può solo ruotare alla velocità dell'intera molecola. Ad esempio, passando da $[\text{Gd}(\text{dota})(\text{H}_2\text{O})]^-$ a $[\text{Gd}(\text{dota-Glu}_{12})(\text{H}_2\text{O})]^-$ (figura precedente) si ha un aumento di peso molecolare da circa 500 a circa 3200 e di conseguenza la rilassività aumenta da circa $4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a circa $23.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La presenza di interazioni non-covalenti è un altro modo per rallentare il *tumbling time* molecolare. Un approccio in questo senso è quello di posizionare catene periferiche idrofobiche che facilitano la interazione del complesso con l'albumina (*Human Serum Albumine*, HSA). L'esempio più noto di questo approccio è il



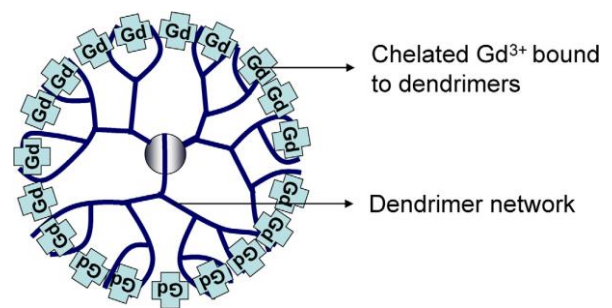
complesso MS-325 (Vasovist[®], vedi figura), la cui rilassività aumenta da 5 a 40 mM⁻¹ s⁻¹ in presenza di HSA. Da notare tuttavia che spesso l'aumento di τ_R dovuto al *binding* con una macromolecola (e.g.



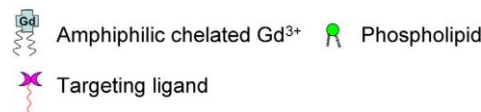
albumina) comporta anche un aumento del tempo di scambio dell'acqua coordinata, τ_M , che influisce negativamente sulla rilassività! Un altro approccio (di tipo non supramolecolare) consiste nel legare covalentemente un certo numero di complessi di Gd(III) a un *carrier* macromolecolare o a un dendrimero (figura) tramite dei chelanti bifunzionali (vedi anche complessi per radio-diagnostica). Se il *carrier* e/o i *linker* sono flessibili e permettono movimenti di *tumbling* locale dei complessi di Gd, l'aumento complessivo di τ_R è tipicamente sempre inferiore a quanto atteso. Quindi per CA polimerici, sia i *linker* che il *carrier* polimerico

dovrebbero essere più rigidi possibile e possibilmente di forma sferica (piuttosto che lineare) per aumentare il *tumbling time* e quindi la rilassività.

L'utilizzazione di vettori biologici, come anticorpi monoclonali o peptidi, per il *targeting* dei CA sarebbe molto utile sia per le applicazioni diagnostiche che per quelle di biologia molecolare. Tuttavia queste molecole sono molto costose e, in generale, non possono essere usate in dosi simili a quelle dei CA già in uso clinico. Inoltre, la concentrazione nell'organismo dei recettori corrispondenti a questi vettori non è



sufficientemente elevata (cioè la sensibilità del metodo è ancora troppo bassa). Per aumentare la sensibilità dei CA per MRI ci sono sostanzialmente due strategie: una è quella di ottimizzare la sensibilità, ovvero la rilassività, del singolo CA (come già visto), l'altra è quella di sviluppare delle **strategie di amplificazione**, per concentrare un elevato numero di CA (e.g. ioni Gd(III)) in uno spazio relativamente piccolo, in modo da avere una rilassività complessiva (non specifica) molto elevata. Sono stati tentati diversi approcci, generando aggregati multi-Gd sia di tipo covalente (e.g. polimeri, dendrimeri, nanotubi, nanoparticelle ...) o non-covalente (e.g. liposomi, micelle, o anche proteine come l'apoferritina o l'albumina come nel caso del Magnevist già discusso).



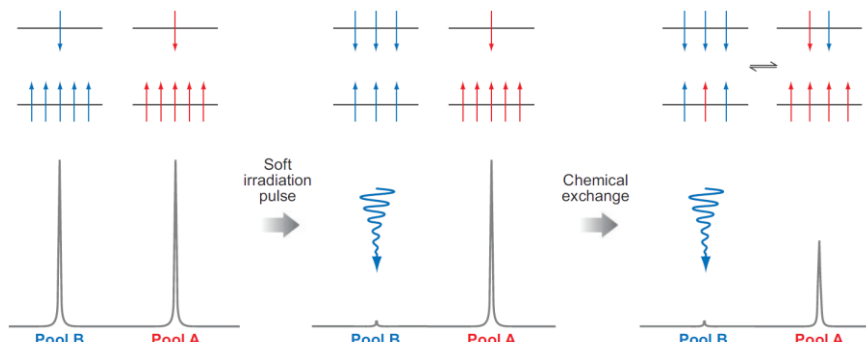
Esempi generici di un dendrimero e di un liposoma “*targettato*” sono illustrati nelle figure. Questo aumento servirebbe soprattutto per portare la tecnica MRI a livello cellulare, come per i radiofarmaci, abbinando i CA a dei *targeting vectors*. Con gli attuali CA di Gd questo non è possibile. Come già detto, un CA commerciale di Gd, con una rilassività di circa 5 mM⁻¹·s⁻¹, per dare un contrasto visibile deve raggiungere una **concentrazione di almeno 125 μM**. Assumendo una stechiometria di binding 1:1 tra Gd e *targeting molecule*, questo richiederebbe che il bersaglio biologico fosse presente a una concentrazione almeno 125 μM! Quindi è chiaro che per raggiungere un *imaging* a livello molecolare la rilassività specifica e/o il numero di Gd per molecola deve aumentare.

Per CA di dimensioni sufficientemente grandi, è anche possibile sfruttare l'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) per il *targeting* dei tumori. Infine è molto probabile che in futuro verranno sviluppati **probe multimodali**, cioè molecole che permettano di combinare diversi tipi di *imaging*, ad esempio la combinazione di MRI con

fluorescenza, SPECT, PET, etc (sempre tenendo conto però della diversa sensibilità di ciascuna tecnica).

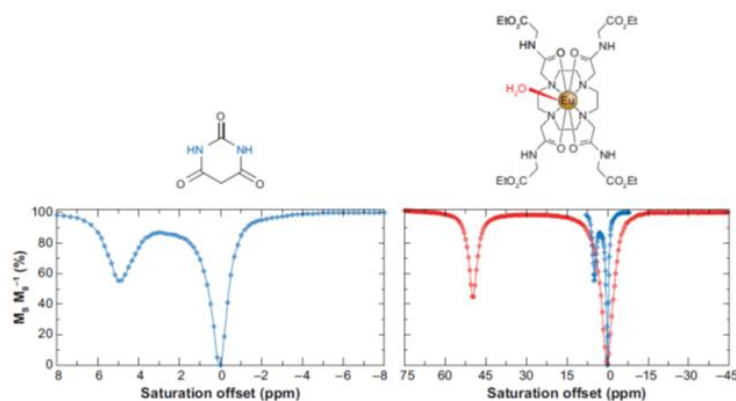
CEST Agents (*Chemical Exchange Saturation Transfer*)

Questa metodologia emergente sfrutta un parametro della tecnica MRI finora non utilizzato e cioè la **frequenza di risonanza**. La tecnica denominata CEST si basa sull'utilizzo di composti mobili che contengano dei **protoni in scambio lento con l'acqua di bulk** (e.g. molecole di H₂O coordinata a ioni metallici, o gruppi -NH o -OH) e sullo sfruttamento della ben nota procedura di trasferimento di saturazione (*saturation transfer*). In questa tecnica, saturando la frequenza di risonanza caratteristica dell'agente (una banda relativamente *sharp*), la saturazione viene trasferita dai



protoni mobili in scambio a quelli dell'acqua di *bulk*, diminuendone l'intensità (come illustrato in figura) e generando così il contrasto. Il requisito fondamentale per un agente CEST è che la velocità di scambio tra i suoi protoni mobili e i protoni dell'acqua di *bulk* (k_{CEST}) sia lenta, o meglio sia più piccola della differenza tra le frequenze di assorbimento dei protoni in scambio (cioè $k_{\text{CEST}} < \Delta\omega$). Se non si verifica questa condizione, cioè se lo scambio è troppo veloce, non si vede un segnale distinto per l'agente CEST, ma la sua risonanza e quella dell'acqua di *bulk* danno un'unica risonanza mediata (cioè avviene la coalescenza delle due risonanze). Una peculiarità unica degli agenti CEST è che il contrasto viene generato "*on demand*", cioè solo quando viene "accesa" la frequenza che satura la risonanza dei protoni in scambio CEST. Di conseguenza, l'immagine pre-contrasto può venire registrata quasi simultaneamente a quelle post-contrasto dal momento che la loro acquisizione differisce solo sullo stato on/off della frequenza di saturazione. Inoltre, con gli agenti CEST è possibile, somministrando più agenti diversi, oppure un solo agente che abbia diversi tipi di protoni in scambio lento, cioè che abbiano frequenze di risonanza diverse (ad esempio protoni di acqua coordinata al metallo e di gruppi del legante), visualizzare più di un agente nella stessa immagine e anche nella stessa regione di spazio (solo cambiando la frequenza di saturazione). Per esempio, potrebbe essere possibile inserire in due tipi diversi di cellule due diversi agenti CEST, iniettarle contemporaneamente e seguire la loro distribuzione nel tempo via MRI. Oppure seguire nel tempo due (o più) parametri in un tessuto, ad esempio pH e concentrazione di un metabolita.

La diminuzione dell'intensità della risonanza in seguito al trasferimento di saturazione dall'agente CEST (cioè in seguito alla saturazione della sua risonanza) dipende da diversi parametri. Infatti, il trasferimento di saturazione dal CEST all'acqua di *bulk* dipende da k_{CEST} , dalla concentrazione dell'agente CEST e dal numero di



protoni mobili fra loro equivalenti (o pseudo-equivalenti, cioè molto simili magneticamente) che vengono saturati applicando la radiazione di opportuna frequenza ed intensità. Gli agenti CEST possono essere sia diamagnetici che paramagnetici (**PARACEST**). Quelli diamagnetici hanno due limiti: la differenza di *chemical shift* tra la risonanza dei protoni da saturare e quella dell'acqua di *bulk* è piccola (in

genere < 5 ppm) e questo implica che i processi di scambio sfruttabili debbano essere relativamente

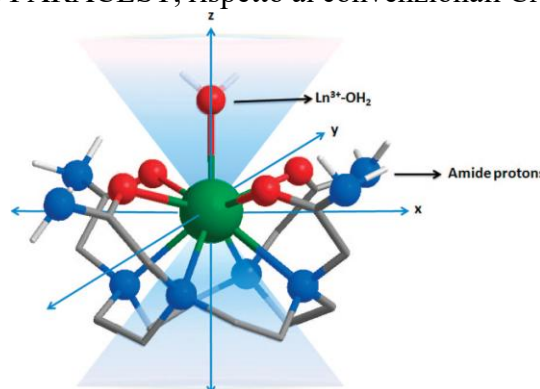
lenti (se fossero veloci il segnale coalescerebbe con quello dell'acqua) e rende inevitabile che avvenga la parziale involontaria saturazione del segnale dell'acqua di *bulk*, diminuendo il contrasto. Gli ioni paramagnetici dei lantanidi sono particolarmente utili come agenti PARACEST perché inducono grandi *chemical shift* per le risonanze dei protoni vicini: questo grande *saturation offset* rende possibile utilizzare processi di scambio più veloci (perché è più grande $\Delta\omega$). La figura rappresenta, lo spettro CEST di un agente diamagnetico (azzurro), come l'acido barbiturico, confrontato sulla stessa scala a quello di un agente paramagnetico di Eu (rosso), dove i protoni in scambio sono quelli della molecola d'acqua coordinata, che è in scambio sufficientemente lento con l'acqua di *bulk*. Da notare che in questo caso, al contrario di quanto visto per i CA tradizionali, è necessario modificare il chelante, tipicamente introducendo gruppi amidici, per fare in modo che la velocità di scambio dei protoni dell'acqua coordinata al complesso paramagnetico non sia troppo veloce!

Finora i PARACEST più studiati sono tutti dello stesso tipo, cioè dei complessi di ioni lantanidi (3+) con due tipi diversi di protoni mobili: *i*) protoni di molecole d'acqua coordinate allo ione Ln(III) e/o *ii*) protoni mobili appartenenti al legante, tipicamente amidici. Dal momento che lo ione Gd^{3+} , avendo 7 elettroni spaiati in 7 orbitali 4f, è isotropo, esso non può funzionare come agente di *shift*, ma altri ioni paramagnetici dei lantanidi con una **distribuzione anisotropica dei loro elettroni f** possono venire utilizzati, e inducono variazioni di *chemical shift* molto grandi dei protoni adiacenti, decine o anche centinaia di ppm. La tabella illustra le proprietà paramagnetiche degli ioni dei lantanidi. Il PRE è il *Paramagnetic Relaxation Enhancement*, e il raggio della sfera gialla indica la distanza alla quale i segnali 1H NMR subiscono un significativo accorciamento del tempo di rilassamento (si vede che il raggio è massimo per il Gd^{3+}). Invece PCS è lo *Pseudo-Contact Shift*, il principale contributo che determina la variazione di *chemical shift* indotta da ciascuno ione sui nuclei vicini e le iso-superfici rappresentano la grandezza e il segno del *chemical shift*: si vede che è nullo per Gd^{3+} , mentre è massimo per Tb^{3+} e Dy^{3+} .

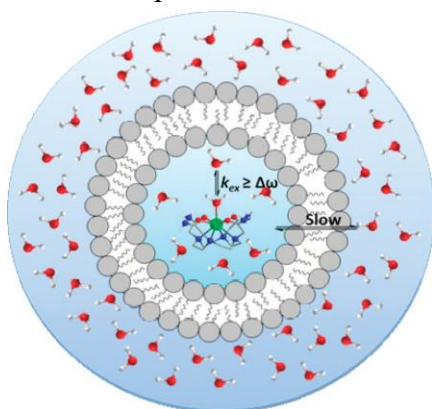
Ln	La ³⁺	Ce ³⁺	Pr ³⁺	Nd ³⁺	Sm ³⁺	Eu ³⁺	Gd ³⁺	Tb ³⁺	Dy ³⁺	Ho ³⁺	Er ³⁺	Tm ³⁺	Yb ³⁺	Lu ³⁺
μ_{eff}/μ_B cald.	0.00	2.54	3.58	3.68	0.85	0.00	7.94	9.72	10.63	10.60	9.59	7.57	4.53	0.00
$\chi/10^{-32}m^3$	0.0	5.6	11.2	11.4	0.6	6.0	55.1	82.7	99.2	98.5	80.3	50.0	18.0	0
$\Delta\chi_{ax}/10^{-32}m^3$	0	2.1	3.4	1.7	0.2	-2.3	0	42.1	34.7	18.5	-11.6	-21.9	-8.3	0
$\Delta\chi_{rh}/10^{-32}m^3$	0	0.7	2.1	0.4	-0.1	-1.6	0	11.2	20.3	5.8	-8.6	-20.1	-5.8	0

Per esempio, i complessi di tulio e disprosio corrispondenti a quello di europio della figura precedente inducono *chemical shift* di segno opposto, come si vede dai colori di PCS nella figura sopra, +500 ppm (Tm^{3+}) e -720 ppm (Dy^{3+}). La figura successiva mostra come in un tipico complesso Ln^{3+} -DOTA-tetraamide la molecola d'acqua coordinata occupa una posizione apicale ed è quindi allineata con l'asse magnetico principale del complesso e perciò risente del *chemical shift* maggiore (vedi PCS nella tabella sopra), mentre i protoni amidici sono situati più lontani dal metallo e in una zona in cui il campo dipolare dello ione Ln^{3+} (indicato dal cono blu) è quasi nullo, per cui essi hanno variazioni di *chemical shift* più piccole e di segno opposto.

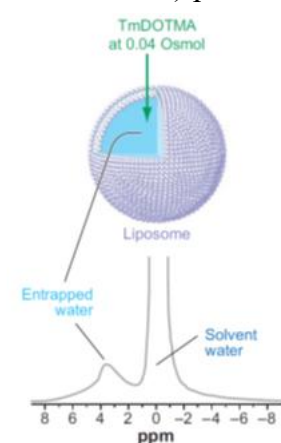
Il principale vantaggio degli agenti CEST, e in particolare PARACEST, rispetto ai convenzionali CA che abbreviano T_1 , è il tipo di informazioni che possono essere ottenute. Infatti, in linea di principio, ogni variazione di qualche parametro (e.g. pH, temperatura) che faccia variare la velocità di scambio dei protoni si rifletterà sui segnali CEST. Cioè i CA di tipo CEST hanno caratteristiche adatte per essere degli agenti di contrasto MRI reattivi (*Responsive* o *Smart*). La definizione di un **agente di contrasto reattivo** (*responsive*) è la seguente: è un agente che fa variare il contrasto di un'immagine in maniera diversa a seconda della presenza di un'altra specie biologica, o di una variazione in qualche parametro fisiologico o biochimico, come pH, concentrazione di O_2 , l'attività di qualche enzima, la presenza di particolari *marker* o metaboliti in un tessuto...



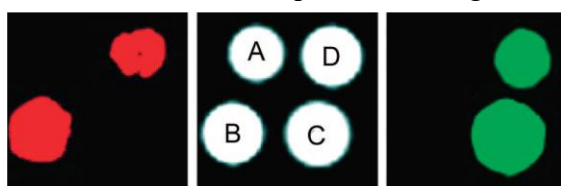
Uno dei maggiori limiti attuali degli agenti di contrasto CEST è che hanno una sensibilità piuttosto bassa: tipicamente la loro concentrazione per avere un contrasto osservabile (5%) deve essere 1 – 10 mM, mentre un CA classico di Gd produce un contrasto del 50% a concentrazioni di circa 50 μM . Un modo semplice (in teoria) di aumentare la sensibilità dei CA CEST è quello di aumentare il numero di protoni scambiabili. In questa ottica sono stati sviluppati i cosiddetti **lipoCEST**, cioè dei liposomi (cioè delle nano-vescicole, con diametro compreso fra 50 e 400 nm, la cui membrana consiste di un doppio strato fosfolipidico) “caricati” all’interno con degli agenti di *shift* paramagnetici (e.g. complessi di europio). In tali liposomi tutte le molecole di acqua presenti all’interno, che sono in scambio lento con quelle esterne (figura), non sono più magneticamente equivalenti a quelle di *bulk* e l’intero liposoma diventa così un’antenna CEST, potenzialmente con un aumento fino a 6 – 8 ordini di grandezza del numero di protoni in scambio (rispetto ai due protoni di una molecola di H_2O coordinata a Eu^{3+}) portando una diminuzione del limite di rilevazione fino a 90 pM. In questo caso



la velocità di scambio dell’acqua coordinata al lantanide con l’acqua di bulk all’interno del liposoma deve essere veloce, così che tutte le molecole di acqua interne risentano degli effetti paramagnetici del reagente di *shift* il più velocemente possibile. Quindi in questo caso il requisito CEST ($\Delta\omega \gg k_{ex}$) deve essere soddisfatto dalla velocità di scambio dell’acqua (o dei protoni) attraverso il doppio-strato lipidico. Poiché la massima concentrazione del reagente di *shift* nel liposoma è limitata dall’osmolarità, il *chemical shift* dell’acqua intra-liposomiale differisce poco da quella di bulk (da +4 a -4 ppm di differenza) e va a cadere nel tipico intervallo di specie endogene con protoni scambiabili che creano interferenze. Il concetto è illustrato in figura. Questo è il principale limite attuale all’utilizzo pratico dei lipoCEST.



Una evoluzione molto recente dei lipoCEST è quella dei cosiddetti **CellCEST**, che sfrutta le molecole di acqua del citosol di una cellula – caricata con un opportuno agente di *shift* – come sorgenti dell’effetto CEST. In quest’ottica, i globuli rossi sono risultati particolarmente adatti.

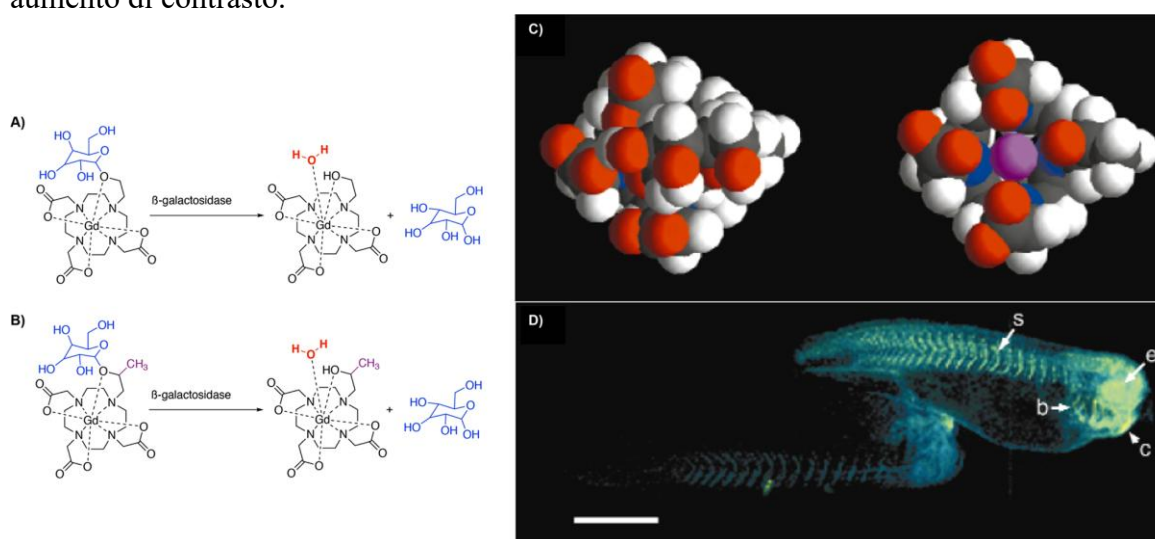


La figura successiva illustra uno dei citati vantaggi dei CA CEST, cioè che in un singolo esperimento si possono usare diversi agenti che vengono selettivamente attivati solo quando si irradia la loro frequenza. L’immagine (in colori arbitrari) mostra dei capillari contenenti cellule dello stesso tipo caricate con

differenti agenti PARACEST: $[\text{Tb-DOTAMGly}]^-$ in B, il corrispondente $[\text{Eu-DOTAMGly}]^-$ in C, mentre D contiene una miscela delle due. Si vede che, irradiando l'una o l'altra delle due frequenze è possibile evidenziare solo uno dei due agenti CEST.

Agenti di contrasto per MRI reattivi (*responsive CA*)

Come già detto, gli attuali CA per MRI tipicamente operano nell'ambiente extracellulare. Con il progredire delle tecniche MRI verso una risoluzione cellulare, molta ricerca si sta rivolgendo allo sviluppo di agenti di contrasto che riescano a penetrare la membrana cellulare (ad esempio legando il chelato col Gd a dei *cell penetrating peptides*), in quanto la maggior parte dei processi fisiologici di interesse avvengono appunto nell'ambiente intracellulare. La strategia per lo sviluppo di agenti di contrasto reattivi (*responsive*) prevede che uno o più dei parametri che influenzano la rilassività (q o τ_M per i CA tipo gadolinio, il *chemical shift* o la velocità di scambio per i CEST) siano modulabili in modo che la rilassività indotta sia diversa prima e dopo il processo di attivazione. Dal momento che i sistemi in fase di studio sono ancora molto lontani da qualsiasi applicazione *in vivo* per i problemi già più volte citati (bassa sensibilità, scarsa penetrazione cellulare, stabilità cinetica e termodinamica..) viene mostrato qui un solo esempio per illustrare il concetto. I CA di prima e seconda generazione (A e B in figura) sono dei sensori dell'enzima β -galattosidasi. In presenza dell'enzima si ha la rapida idrolisi del galattosio, che libera una posizione di coordinazione per una molecola di acqua (da $q = 0$ a $q = 1$), attivando il CA. Nella figura in basso sono mostrati due embrioni per i quali si monitora il segnale dell'acqua. L'aggiunta del solo CA 0,5 mM (sinistra) aumenta di poco il contrasto, ma l'aggiunta dell'enzima β -galattosidasi 4 μM (destra) genera un notevole aumento di contrasto.



Altri agenti di contrasto

Nanoparticelle fatte di materiali ferromagnetici, quando siano al di sotto di una certa dimensione, possono esibire un tipo di magnetismo unico, detto **super-paramagnetismo**. Nanoparticelle super-paramagnetiche di ossido di ferro (*SuperParamagnetic Iron Oxide nanoparticles, SPIO*) vengono utilizzate come agenti di contrasto in MRI. Queste particelle sono molto efficaci nell'accorciare il tempo di rilassamento trasversale, T_2 , dei protoni dell'acqua. Le caratteristiche rilassometriche e farmacologiche delle SPIO dipendono principalmente dalle loro dimensioni. Tipicamente le SPIO sono formate da un *core* cristallino di magnetite (Fe_3O_4) e γ -maghemite (Fe_2O_3) ricoperto da un opportuno materiale (*coating*, vedi dopo), con diametri compresi tra 60 e 250 nm. Le dimensioni delle nano-particelle, dato il ruolo fondamentale svolto da questo parametro, rappresentano la prima difficoltà per questa classe di agenti di contrasto, ossia è piuttosto difficile controllare dimensione e dispersione e, più in generale, avere delle metodologie di preparazione riproducibili. Infatti, la sintesi di SPIO di dimensioni definite è spesso un processo difficile da controllare, soprattutto a causa della natura colloidale della ferrite. Una volta che la preparazione del *core* cristallino sia stata ottimizzata, la particella, per essere utilizzabile *in vivo*, deve essere ricoperta con un materiale biocompatibile. Il

ricoprimento può venire fatto con PEG, o materiali polimerici come destrano, amido, glicosamminoglicano, silossani organici, copolimeri stirene-divinilbenzene solfonati. Il ricoprimento è fondamentale per prevenire l'aggregazione delle particelle e la loro sedimentazione e generare invece una dispersione colloidale stabile, pronta per l'uso clinico. Inoltre, il tipo di *coating* è importante per definire il comportamento farmacocinetico della nanoparticella. Tuttavia, nonostante il ricoprimento idrofilo spesso presente sulla loro superficie, le SPIO prima o dopo vengono catturate dai macrofagi, sia quelli in circolazione che residenti nei tessuti, e quindi si localizzano principalmente in fegato e milza. Per questo motivo le principali indicazioni diagnostiche che si possono ottenere dalle nanoparticelle di ossidi di ferro riguardano la visualizzazione del fegato. La tabella riporta gli agenti di contrasto basati su SPIO approvati per uso clinico o in fase di valutazione clinica (2012).

Pre-Clinical Agent	Commercial Name	MR Target	Status
AMI-25	Ferumoxide, Feridex, Endoderm	Liver	Approved
OMP	Abdoscan	Bowel	Approved
AMI-121	Gastromark, Ferumoxsil, Lumirem	Bowel	Approved
SHU555A	Resovist	Liver	Approved (EU, Japan, Australia), Phase III (USA)
AMI-227	Combidex, Sinerem, Ferumoxtran	Lymph Node Metastases	Phase III
CODE 7228	Feraheme, Ferumoxytol	Vasculature	Phase II

Uno dei principali svantaggi delle SPIO è legato al tipo di meccanismo di contrasto che esse generano. Infatti, il loro effetto sulle immagini MRI consiste in una diminuzione del segnale (le immagini sono più scure) e questo impedisce che possano essere usate per l'*imaging* di parti di un organismo in cui il segnale sia già intrinsecamente basso. In compenso però, le SPIO sono i migliori agenti di contrasto potenziali per esperimenti di *imaging* a livello cellulare. Infatti, le nanoparticelle hanno una sensibilità molto elevata, tanto da essere efficaci già a livello nanomolare. La loro elevata sensibilità e il fatto che vengono facilmente internalizzate dalle cellule, tramite *uptake* passivo o attivo, le rendono particolarmente adatte ad essere utilizzate in esperimenti di *labeling* cellulare, dopo essere state funzionalizzate con *targeting vectors*.

Articoli recenti (2025) mostrano tuttavia un rinascimento dell'interesse nelle nanoparticelle come agenti di contrasto per MRI, dovuto soprattutto alla tossicità degli agenti di Gd. Si sta anche cercando di sviluppare delle tecniche per poterle utilizzare come agenti T1.