UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
JULIANA DOS SANTOS ROSA

**Carreador lipídico nanoestruturado multifuncional contendo 5-fluorouracil e
siRNA para tratamento de câncer de pele**

Ribeirão Preto

2019

RESUMO

Rosa, J. S. **Carreador lipídico nanoestruturado multifuncional contendo 5-fluorouracil e siRNA para tratamento de câncer de pele**. 2019. 160p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O tratamento de câncer baseado em plataformas multifuncionais tem sido, de forma geral eficientes, pois tratam-se de terapias que atuam de forma simultânea em mais de uma das vias da patogênese no câncer. Neste sentido, a co-administração de fármacos antimetabólicos, tal como o 5-Fluorouracil (FU) e *small interference* RNA (siRNA) específicos para alvos do câncer, representam uma estratégia racional para o tratamento do câncer de pele. O 5FU é um fármaco que possui importante aplicação no tratamento tópico do câncer de pele. No entanto, sua baixa meia vida e altas toxicidades cutânea e sistêmica impede a adesão correta ao tratamento. Um dos grandes alvos para tratamentos de tumores, são as proteínas da família BCL-2, estas impedem que a cascata da apoptose se ative. Uma das maneiras mais eficazes para reduzir a super expressão de proteínas, é o uso de *small interfering* RNA (siRNA) específicos, que impedirão que o RNA mensageiro seja traduzido na proteína alvo. Entretanto, aspectos físico-químicos e biológicos do 5FU e de siRNA impedem uma adequada biodisponibilidade no tecido cutâneo após aplicação tópica. Desta forma, o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para a co-administração do 5FU e de siRNA específico para proteína BCL-2, representa uma alternativa para a redução dos efeitos adversos e o aumento da segurança terapêutica. Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) para encapsular o 5FU e complexar com siRNA BCL-2, além de sua avaliação *in vitro* para perfis de liberação, permeação cutânea, retenção cutânea, bem como viabilidade e transfecção celular, além de ensaios *ex vivo* visando conhecer as características de interação com a pele humana, e por fim, avaliação da atividade antiproliferativa e apoptótica. Os resultados obtidos demonstram que o CLN desenvolvido possui diâmetros de partículas, índices de polidispersão e potencial zeta adequados para exercer sua função, se mostrou estável, além de ter encapsulado o 5FU e complexado com o siRNA de maneira eficiente. O CLN apresentou perfis de permeação e retenção cutânea *in vitro* promissoras para aplicação tópica dos agentes terapêuticos em questão. A viabilidade celular indicou que o CLN desenvolvido possui IC₅₀ menores para as linhagens tumorais, além de apresentarem transfecção celular comparado com o controle Lipofectamina 2000®. Os ensaios *ex vivo* foram indispensáveis para entender o comportamento do CLN desenvolvido na pele humana e o mesmo impediu o estrato córneo de descamar, devido ao filme lipídico oclusivo que formou, sendo esta uma observação inédita no modelo hOSEC. Os ensaios de atividade, por ELISA, Western Blot e qRT-PCR se complementaram e apontaram que o CLN foi capaz de reduzir significativamente, a proliferação das linhagens tumorais e o RNAm para a proteína BCL-2. Estes resultados em conjunto cooperam entre si para que o CLN em questão seja considerado promissor para o tratamento tópico do câncer de pele.

Palavras-chave: *Co-delivery*, Nanopartícula multifuncional, siRNA BCL-2, Terapia de silenciamento gênico, Câncer de pele não melanoma, Melanoma, Nanotecnologia.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 15% da massa total corporal, contendo uma superfície de em média 2 m². As funções deste órgão são inúmeras, ressaltando a função de regulação da temperatura corporal, o controle da perda de água e temperatura através do suor, e a função de proteção contra agentes externos como microrganismos e radiações. A estrutura e condição da pele variam de acordo com o local do corpo, idade, etnia, gênero, índice de massa corporal (IMC) e a sua permeabilidade pode ser alterada de acordo com o grau de destruição da integridade do estrato córneo (EC), uso de substâncias que promovem a permeação entre outros (DĄBROWSKA; ROSSI, 2018).

A pele possui três camadas principais, como pode-se observar na Figura 1-A: epiderme, derme e hipoderme ou tecido subcutâneo. Além disso, estão presentes os apêndices ao longo das camadas, tais como, folículos pilosos e pelos, glândulas (LEMOS *et al.*, 2018; NAFISI; MAIBACH, 2018; ROSA *et al.*, 2018).

A camada mais externa da pele é a epiderme, importante para a função barreira que este tecido desempenha. A epiderme apresenta uma espessura média de 1 mm, mas pode variar de acordo com a parte do corpo, e esta pode ser dividida em duas subcamadas: o estrato córneo (EC) e a epiderme viável (EP) (LEMOS *et al.*, 2018).

As células que compõe o EC são queratinócitos conhecidos como corneócitos, e entre estes corneócitos há uma matriz lipídica, e esta confere a propriedade barreira a esta camada. A espessura média do EC varia entre 6 a 13 µm (BAROLI, 2010; LEMOS *et al.*, 2018).

A EP é um tecido avascular, dinâmico e auto renovável no qual as células migram até o EC, isto é, um processo de descamação. As células epiteliais, ou queratinócitos, estão organizadas, mais internamente em estrato basal, sobre este está o estrato espinhoso, e anterior ao EC está o estrato granuloso. Cada camada é definida por posição, forma morfológica e estado de diferenciação dos queratinócitos. Na EP há grande quantidade de água, o que determina sua característica hidrofílica (LEMOS *et al.*, 2018; NAFISI; MAIBACH, 2018).

A segunda camada da pele, localizada mais profundamente, a derme, é altamente vascularizada por vasos sanguíneos e linfáticos, que transpassam fibras de colágeno e elastina que compõem essa camada da pele. Nesta camada, o colágeno, produzido pelos fibroblastos, é o componente extracelular mais abundante, sendo o responsável pela função de proteção mecânica. Na derme também encontramos células imunes como mastócitos, linfócitos e macrófagos. Dependendo da localização no corpo, a espessura da derme varia de 0,3 a 5 mm (LEMOS *et al.*, 2018; NAFISI; MAIBACH, 2018).

Existem três rotas que podem ser usadas por substâncias, para penetrar no tecido cutâneo: via intercelular, via transcelular, e transapêndices (Figura 1-B) (DĄBROWSKA; ROSSI, 2018; LEMOS *et al.*, 2018; NAFISI; MAIBACH, 2018).

Figura 1: Estrutura anatômica da pele enfatizando (A) suas camadas, apêndices e ênfase na estrutura e composição do estrato córneo; e (B) as possíveis rotas de penetração de substâncias na pele.

Adaptado de (LEMOS *et al.*, 2018)

A via intercelular é o transporte de substâncias que se dá entre as células do EC. Esse mecanismo depende da natureza da molécula que irá penetrar, sua difusão, peso, solubilidade, lipofilicidade. Esta via é extremamente longa e dificultada, o que reduz significativamente a taxa de penetração de substâncias através deste mecanismo (DĄBROWSKA; ROSSI, 2018; NAFISI; MAIBACH, 2018).

A via transcelular é o transporte através dos queratinócitos. Este caminho é muito seletivo visto que a molécula que irá penetrar por ele deve apresentar

caráter lipofílico para atravessar as membranas, mas também deve apresentar certa hidrofília para atravessar o conteúdo celular (DĄBROWSKA; ROSSI, 2018; NAFISI; MAIBACH, 2018).

A via transapêndices envolve a passagem de moléculas pelos apêndices (glândulas sudoríparas e sebáceas e folículos pilosos). Esta é a via de maior penetração para moléculas de baixo peso molecular e solúveis em água. Moléculas maiores são capazes de penetrar através das aberturas dos folículos pilosos. Embora seja uma via facilitada, a via transapêndices é considerada a menos significativa, pois os anexos cobrem apenas 0,1% da superfície da pele. Porém, os apêndices podem desempenhar um papel reservatório de substâncias aplicadas topicamente e, portanto, é considerado uma via de penetração eficiente (DĄBROWSKA; ROSSI, 2018; NAFISI; MAIBACH, 2018).

Nas últimas décadas, a utilização do tecido cutâneo como forma de administração de medicamentos emergiu como uma abordagem promissora e alternativa à administração oral. Além do aumento da incidência de doenças de pele associado à demanda por tratamentos direcionados vem induzindo o desenvolvimento de preparações farmacêuticas de aplicação tópica para fármacos de uso predominante oral e/ou injetável (IQBAL *et al.*, 2018).

Neste sentido, tanto para uso cosmético, como para o tratamento tópico de doenças de pele, a penetração de substâncias é desejada, mas, devido às suas características físico-químicas, nem todas as moléculas são capazes de penetrar o tecido cutâneo de forma passiva em concentrações adequadas pela desempenhar seus efeitos terapêuticos. Desta forma, várias estratégias tem sido empregadas para otimizar a penetração e/ou permeação de substâncias aplicadas na pele, uso de promotores de absorção cutânea, sistemas de liberação nanoestruturados, métodos físicos, entre outros (DĄBROWSKA; ROSSI, 2018; LEMOS *et al.*, 2018).

1.2. Câncer de pele

O câncer de pele é uma das doenças mais prevalentes atualmente no mundo e é considerada a malignidade mais comum diagnosticada, mesmo diante da dificuldade de discernimento entre seus tipos malignos e benignos (APALLA *et al.*, 2017; ESTEVA *et al.*, 2017; HAY *et al.*, 2014).

Existem dois tipos de câncer de pele, não melanoma e melanoma, e estes se diferenciam de acordo com o comprometimento das camadas na pele e seu potencial de invasividade e migração para outros tecidos. O câncer de pele não melanoma (CPNM) é o câncer mais diagnosticado e este tipo se divide majoritariamente em cancer basal e cancer escamoso, onde a camada da pele acometida é quem os classifica, mas ainda são superficiais quando comparados com o melanoma (DIDONA et al., 2018).

Dos diagnósticos realizados para câncer de pele não melanoma, o câncer basal é o mais comum, representando 70%, e o cancer escamoso representa 25%. Ambos, basal e escamoso, apresentam bons prognósticos (DIDONA et al., 2018).

O CPNM aumenta sua prevalência de acordo com o aumento da idade e estima-se que em 2050 em torno de 32% da população mundial acima de 60 anos apresentará este tipo de câncer de pele (APALLA et al., 2017; HAY et al., 2014).

Para o tipo melanoma, os riscos de desenvolvê-lo são de 2,4% para caucasianos, seguido de 0,5% para os latinos e com os menores riscos seguem a população negra com apenas 0,1%. A população masculina tem 1,5 vezes mais chances de desenvolver um melanoma do que a população feminina (APALLA et al., 2017).

Entre os tipos de câncer de pele, não melanoma e melanoma, o tipo não melanoma é 18 a 20 vezes mais prevalente que o tipo melanoma, mas há uma estimativa de 91270 diagnósticos novos de melanoma em 2018, apenas nos Estados Unidos. O potencial metastático do cancer não melanoma é baixo, indicando apenas 0,00281 a 0,05 % para o câncer basal e 0,5 a 9,9% para o câncer escamoso. As taxas de sobrevivência para o câncer basal são de 102,9% e para câncer escamoso é de 93,6%. Em contrapartida, o melanoma representa apenas 3% do câncer de pele diagnosticado mas o mesmo é responsável por 83% dos casos de morte (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018; APALLA et al., 2017; BARTON et al., 2018; DIDONA et al., 2018; SWEENEY et al., 2017).

No Brasil, o cenário mundial se reproduz, de acordo com dados do Instituto nacional do câncer (INCA), estimam-se cerca de 85 mil novos casos de câncer de pele não melanoma entre homens e mulheres no biênio 2018-2019. Quanto ao tipo melanoma, são apresentadas baixas incidências (2.920 casos novos em

homens e 3.340 casos novos em mulheres), porém elevadas letalidades (INCA, 2018).

Embora teoricamente há uma fácil separação entre os tipos de câncer de pele e seus subtipos, na prática, no momento do diagnóstico há uma evidente dificuldade, devido à proximidade entre eles, e isso dificulta o início do tratamento correto e a tomada de decisões, conforme mostrado na Figura 2 (ESTEVA et al., 2017).

Figura 2: Imagens das apresentações cutâneas de alguns tipos de câncer de pele malignos e benignos.

Adaptado de (ESTEVA et al., 2017)

O CPNM por apresentar grande incidência na população mundial, recebe alto incentivo em pesquisa para o entendimento das suas vias de desenvolvimento. Sobre os fatores que estão envolvidos com sua patogênese sabe-se que o grande responsável são os raios UV, raios-X e produtos químicos (arsênio por exemplo), e ainda existe uma associação deste tipo de câncer com HPV. Existem dados que apontam que seu risco de desenvolvimento aumenta com a idade, devido ao número de exposição aos fatores de risco (DIDONA et al., 2018; MONTAGNA; LOPES, 2017).

As exposições solares estão associadas tanto ao surgimento de cancer basal quanto cancer escamoso, e a exposição a radiações por raios-X,

tratamentos com radiações estão associados ao surgimento do câncer basal. O câncer escamoso por sua vez, inicia normalmente na forma de queratose actínica, lesões de pele iniciais e superficiais, que evoluem e invadem o tecido cutâneo. Sabe-se que em torno de 16% das queratoses actínicas se transformam em câncer escamoso (DIDONA et al., 2018).

Novos tratamentos vem sendo requeridos para o tratamento do câncer de pele, entre esses pode-se encontrar pesquisas sendo realizadas em torno de fármacos convencionais buscando uma inovação disruptiva, além do uso de terapias direcionadas como anticorpos e terapias gênicas, e inovações como combinações de terapias (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

1.3. 5-Fluorouracil (5FU)

O câncer de pele quando diagnosticado em fases iniciais e sem riscos de invasão tecidual, tem como opção o tratamento tópico. O 5FU (Figura 3) é um fármaco muito utilizado para o tratamento tópico do câncer de pele, porém ele apresenta efeitos adversos que impedem a adesão do paciente ao tratamento, além de já existirem trabalhos apontando resistência celular a esta molécula (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

Figura 3: Estrutura molecular do fármaco 5-Fluorouracil.

O 5FU foi apontado em 1957 como um novo fármaco antitumoral, e este em conjunto com outras moléculas sintetizadas com o mesmo propósito foram chamados de pirimidinas fluoradas (HEIDELBERGER *et al.*, 1957).

A molécula do 5FU nada mais é que uma pirimidina, uracila, com um flúor inserido no carbono 5. Intracelularmente, o 5FU é convertido em vários metabolitos ativos tais como: fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). O

metabólito ativo FdUMP impede que haja ação correta da enzima timidilato sintase (TS). A TS é uma enzima que catalisa a conversão de monofosfato de desoxiuridina em monofosfato de desoxitimidina. Com a inibição da TS, surge um desequilíbrio de desoxinucleótidos e níveis aumentados de dUMP e ambos causam danos no DNA. Associados a este dano ao DNA, o metabólito ativo FdUTP, causa ainda mais danos ao DNA. E por fim, o último metabólito ativo, FUTP é incorporado e causa erros ao RNA (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O passo limitante para a ação do 5FU é a enzima diidropirimidina desidrogenase (DPD), que converte o 5FU em di-hidrofluorouracil (DHFU), um metabólito inativo que é rapidamente eliminado. Mais de 80% do 5FU administrado intravenoso é catabolizado, principalmente no fígado, onde DPD é abundantemente expressa (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O 5FU é efetivo para diversos tipos de câncer incluindo colorretal, mama, pele, linfomas, leucemias e outros tumores sólidos (JORDAN, 2016). Há 785 estudos clínicos registrados (clinicaltrials.gov) contendo 5FU administrado sozinho ou associado para diversos tipos de câncer.

O tratamento de câncer de pele com 5FU foi relatada em 1971, no qual o 5FU foi indicado como uma ferramenta eficaz contra este tipo de câncer (WILLIAMS, 1971). Desde então, o tratamento tópico de câncer de pele, utilizando formas farmacêuticas convencionais contendo 5FU já foi amplamente estudado. No entanto os inúmeros efeitos adversos e toxicidade impedem que o tratamento continue e dificultam a adesão do paciente. Diversos relatos de casos recentes apresentam os efeitos tóxicos tópico e sistêmico do 5FU, o que levaram à descontinuidade dos tratamentos (CHUGHTAI *et al.*, 2017; KISHI; PRICE, 2018).

Diante desta toxicidade, o 5FU passou a ser amplamente utilizado associado a nanotecnologia com o intuito da diminuição da dose e dos efeitos adversos, melhor direcionamento e diminuição da degradação do fármaco. Vários tipos de nanopartículas já foram reportadas contendo 5FU para câncer, visando aplicações tópicas ou sistêmicas (CAMACHO *et al.*, 2016; EL-HAMMADI *et al.*, 2017; MIRANDA DA COSTA; MORAES, 2003; PETRILLI *et al.*, 2017; PETRILLI; ELOY; SAGGIORO; *et al.*, 2018; SUBUDHI *et al.*, 2015; TUMMALA; SATISH KUMAR; PRAKASH, 2015; WANG, JIAN-MING *et al.*, 2007; YASSIN *et al.*, 2010).

1.4. Terapia Gênica

De acordo com a FDA, a terapia gênica humana é a administração de material genético para modificar ou manipular a expressão de um produto genético ou para alterar as propriedades biológicas de células vivas para uso terapêutico (FDA, 1993). A terapia gênica procura tratar uma doença transferindo um ou mais ácidos nucleicos terapêuticos para as células de um paciente ou corrigindo um gene defeituoso, por exemplo, por edição genética. Assim, esta abordagem tem o potencial de curar doenças que não são tratáveis com medicamentos convencionais (KUMAR *et al.*, 2016).

De forma simplificada, os passos envolvidos em uma terapia gênica são: a identificação do gene responsável pela doença em questão, o isolamento gênico de um vetor (escolhido com base na célula-alvo e doença), a transferência para as células do tecido-alvo e a produção e/ou silenciamento do gene ou proteína alvo.

Independente do vetor escolhido, os objetivos da terapia gênica são: introduzir um gene ausente, substituir um gene que esteja mutado ou inibir a expressão de um gene (silenciamento gênico) ou proteína, responsáveis pela manifestação de doenças específicas. Estes objetivos podem ser alcançados introduzindo uma sequência de codificação (gene codificador) ou sequências nucleotídicas que, quando expressas, originam sequências anti *sense* (RNAm). Também através da utilização de RNA interferente (iRNA), que inibirá a tradução da proteína ou uso de microRNA (miRNA) que se liga aos mRNAs, que transportam sequências complementares, reprimindo a expressão gênica (LINDEN, 2010).

Atualmente, o método predominante na pesquisa científica tem sido o silenciamento gênico. Se um gene produz uma proteína não funcional, prejudicial e ou uma proteína inerente a uma doença, RNAs interferentes tem sido usados, impedindo a transcrição destas proteínas (VICENTINI *et al.*, 2013).

O uso de *small interfering* RNA (siRNA) tem sido cada vez mais utilizado para tratar doenças que expressam em excesso certas moléculas, como as proteínas por exemplo. Desta forma, o siRNA irá silenciar temporariamente (duração do tratamento) a produção destas moléculas, que não estão necessariamente relacionadas a mutações genéticas, mas com sua super expressão, como no

caso de diversas proteínas super-expressas em câncer (ROSA *et al.*, 2018; VICENTINI *et al.*, 2013).

A descoberta do RNA como agente silenciador foi o vencedor de um prêmio Nobel (FIRE *et al.*, 1998), no qual o mecanismo de RNAi foi visto como um processo celular natural (Figura 4), que nada mais é que um mecanismo de defesa que regula a expressão gênica nas células.

Figura 4: Mecanismo de ação de iRNA via siRNA, shRNA e pro miRNA.

Adaptado de (ROSA *et al.*, 2018)

Em mecanismos celulares normais, os siRNAs são processados a partir de dsRNAs exógenos por um membro da RNase III chamado Dicer. Os dsRNAs possuem cadeias mais longas, e são então clivados em sequências por volta de 20 a 24 nucleotídeos. Os siRNAs processados são carregados pelo Dicer e montados após o carregamento no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Após a formação do complexo com RISC, siRNAs mostram uma complementaridade ao seu mRNA alvo com uma clivagem ocorrendo a partir da extremidade 5', assim esta complementariedade com o RNAm é realizada e o

RNA_m é clivado e impedido de ser traduzido na proteína específica (ROSA *et al.*, 2018; WITTRUP; LIEBERMAN, 2016).

Naturalmente, a inibição via RNAi também é desencadeada pelo RNA curto hairpin (shRNA) e microRNA (miRNA).

Atualmente as tecnologias de RNAi usam esse maquinário natural para movimentar siRNA nas células. Um método comumente utilizado para aproveitar a via do RNAi é a transfecção de siRNAs em células, através de poliplexos, lipoplexo e nanopartículas. Desta forma, através dos vetores, o siRNAs são entregues no citoplasma celular, e seguem a via RNAi como se fossem siRNAs gerados pelo complexo Dicer (ROSA *et al.*, 2018).

Na Tabela 1 estão expostos os ensaios clínicos registrados com siRNA para terapias de câncer de diversos tipos, evidenciando o uso e a evolução desta terapia inovadora.

siRNAs vem sendo aplicados para tratar doenças, porém, o grande desafio para estas moléculas são as barreiras biológicas, que no caso da pele, é o EC. Para superar estas dificuldade de penetração no tecido são utilizados vetores que carregam os siRNAs até o citoplasma das células, para que os mesmos possam agir (BORGHETI-CARDOSO *et al.*, 2017; DEPIERI *et al.*, 2016; DOWDY, 2017; FOLDVARI *et al.*, 2016; SARETT; NELSON; DUVALL, 2016; TOFANI *et al.*, 2018).

Tabela 1: Relação de *Clinical Trials* utilizando siRNAs através ou não de nanopartículas, para tratamento de Câncer (Fonte: clinicaltrials.gov), N.A= não se aplica, palavras-chave da busca: Cancer e siRNA.

Tipo de Câncer	siRNA	Nanopartícula	Título do estudo (original)	Status	Fase	Número de Identificação	Data de início	Data de fim / Estimada
Adenocarcinoma Pancreático Metastático	KRAS G12D	N.A	iExosomes in Treating Participants With Metastatic Pancreas Cancer With KrasG12D Mutation	Ainda não está recrutando	I	NCT03608631	Agosto de 2018	N.A
Câncer avançado/recorrente	EphA2-DOPC	Lipossoma	EphA2 Gene Targeting Using Neutral Liposomal Small Interfering RNA Delivery	Recrutando	I	NCT01591356	Julho de 2015	Julho 2020
Tumores sólidos avançados	Atu027	N.A	Study With Atu027 in Patients With Advanced Solid Cancer	Completo	I	NCT00938574	Julho de 2009	Abril de 2013
Colorretal, pâncreas, gástrico, ovário e mama metastáticos	PLK1	Nanopartícula lipídica sólida	TKM 080301 for Primary or Secondary Liver Cancer	Completo	I	NCT01437007	Setembro de 2011	Agosto de 2018
Tumores sólidos	R2	Ciclodextrina	Safety Study of CALAA-01 to Treat Solid Tumor Cancers	Terminado	I	NCT00689065	Junho de 2008	Novembro de 2013
Melanoma, pâncreas e rins recorrentes, Pâncreas estágio III e IV, Renais estágio III e IV, Melanoma estágio III e IV e outros tumores sólidos	APN401	N.A	APN401 in Treating Patients With Melanoma, Kidney Cancer, Pancreatic Cancer, or Other Solid Tumors That Are Metastatic or Cannot Be Removed By Surgery	Completo	I	NCT02166255	Junho de 2014	Maio de 2016
Melanoma Metastático	immunoproteasoma alters	N.A	Immunotherapy of Melanoma With Tumor Antigen RNA and Small Inhibitory RNA Transfected Autologous Dendritic Cells	Completo	I	NCT00672542	Maio de 2008	Janeiro de 2014
Neoplasia Maligna Metastática no Cérebro, colorretal e pâncreas	APN401 IV	N.A	APN401 in Treating Patients With Recurrent or Metastatic Pancreatic Cancer, Colorectal Cancer, or Other Solid Tumors That Cannot Be Removed by Surgery	Recrutando	I	NCT03087591	Março de 2017	Março de 2019

Próstata andrógeno independente	Hsp27	N.A	Analysis of the Mechanisms of Actions of Heat Shock Protein (Hsp27) Responsible of the Androgen-independent Evolution in Prostate Cancer	Terminado	N.A	NCT02055846	Fevereiro de 2014	Junho de 2015
Múltiplo Mieloma, não Hodgkins Linfoma, Pâncreático neuroendócrino	MYC	Lipídica	Phase I, Multicenter, Dose Escalation Study of DCR-MYC in Patients With Solid Tumors, Multiple Myeloma, or Lymphoma	Terminado	I	NCT02110563	Abril de 2014	Dezembro de 2017
Adenocarcinoma de Pâncreas	siG12D LODERs	Matriz polimérica biodegradável	Phase I - Escalating Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Locally Advanced Adenocarcinoma of the Pancreas, and a Single Dose Study of siG12D LODER (Local Drug EluteR) in Patients With Non-operable Adenocarcinoma of the Pancreas	Completo	I	NCT01188785	Agosto de 2010	Novembro de 2014
Pancreático	siG12D-LODERs combinado com Gemcitabina + nab-Paclitaxel	N.A	A Phase 2 Study of siG12D LODER in Combination With Chemotherapy in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer (PROTACT)	Recrutando	II	NCT01676259	Março de 2018	Junho de 2020
Leucemia mieloide crônica	Não determinado	N.A	Use of SV40 Vectors to Treat Chronic Myeloid Leukemia (CML)	Completo	I	NCT00257647	Novembro de 2005	Fevereiro de 2009
Hepatocelular	MYC	Lipídica	Phase Ib/2, Multicenter, Dose Escalation Study of DCR-MYC in Patients With Hepatocellular Carcinoma	Terminado	I	NCT02314052	Dezembro de 2014	Setembro de 2018
Neuroblastoma	MYCN	N.A	The Role of Aromatic Hydrocarbon Receptor in the Tumorigenesis of Neuroblastoma and Its Relationship With MYCN Expression	Completo	I	NCT01075360	Agosto de 2008	Abril de 2009

1.5. Família das proteínas BCL-2

Em muitos tumores, incluindo os cutâneos, o processo de morte é uma importante via. A morte celular normalmente, em tumores, se encontra desregulada, e este fato pode ter como consequência uma resistência aos tratamentos disponíveis. O processo de apoptose ocorre em todas as células e tecidos, e é este processo que impede que células com problemas de replicações e/ou mutações continuem se proliferando. Quando este processo está suprimido, há o surgimento de tumores. A família das proteínas BCL-2 são proteínas envolvidas nos processos da cascata apoptótica. O balanço na expressão de proteína pro e anti apoptóticas garante a sobrevivência de células aptas a replicarem. A BCL-2 é uma proteína da família BCL-2 que possui uma atividade anti apoptótica e esta foi encontrada super-expressa em diversos tumores e é considerada a chave para o contínuo desenvolvimento dos tumores, tendo a via das caspases inibida (SERASINGH *et al.*, 2015; VOGLER, 2014). A família BCL2 é um grupo de 20 proteínas que podem ser divididas em três grupos, as proteínas antiapoptóticas como a própria BCL-2, BCL-XL, MCL1, BCL-B, BCL-w e BCL2A1, e proapoptóticas, como BAX e BAK (VOGLER, 2014).

Vários modelos explicam como as proteínas BCL-2 interagem para regular a apoptose. A BAX e BAK podem oligomerizar e induzir a formação de um poro através do qual o citocromo pode ser liberado no citosol. As proteínas antiapoptóticas, por sua vez, são geralmente integradas à membrana externa da mitocôndria, na qual protegem esta membrana e impedem a liberação do citocromo (SERASINGH *et al.*, 2015; VERHAEGH *et al.*, 1995; VOGLER, 2014).

A proteína BCL-2 foi descoberta como um oncogene em células B. No entanto, também é expressa em tecidos linfóides normais, incluindo células T. BCL-2 também é expresso em tecidos não-linfóides, como o sistema nervoso e epitélio. A evidência de que a BCL-2 pode ter potencial oncogênico em carcinomas foi primeiramente observado em câncer de próstata, onde a alta expressão de BCL-2 foi encontrada em tumores independentes de andrógeno. Desde então, altas expressões de BCL-2 tem sido relatada em diferentes tipos de tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão, câncer de ovário, mama e câncer de pele não melanoma e melanomas (VERHAEGEN *et al.*, 2014; VERHAEGH *et al.*, 1995; VOGLER, 2014).

A expressão de BCL-2 em tumores está relacionada com prognóstico e esta proteína tem sido alvo recorrente para o tratamento de câncer. Os inibidores de BCL-2 podem estar ou não associados a outros agentes antitumorais (VOGLER, 2014).

1.6. Nanopartículas

As nanopartículas em geral surgiram como veículos para carrear fármacos e auxiliá-los nas suas limitações farmacocinéticas inerentes às suas estruturas moleculares. As nanopartículas são vantajosas no que diz respeito a prolongar a vida útil e melhorar a estabilidade dos fármacos frente ao ambiente em que se encontram até chegar ao seu alvo (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; WICKI *et al.*, 2015).

Para uso sistêmico, as nanopartículas ainda podem apresentar um grande aumento da permeabilidade e retenção, conhecido como efeito EPR, promovendo então um maior acúmulo dos agentes ativos nos tumores (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015).

O uso de nanopartículas para encapsular quimioterápicos para diversos tipos de câncer se mostrou ser eficiente e a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou já a algum tempo exemplos disso, tais como Doxil[®], um lipossoma contendo doxorubicina; Abraxane[®], uma nanopartícula de albumina contendo Paclitaxel e mais recentemente, Onivyde MM-398[®], um lipossoma contendo Irinotecan para câncer metastático pancreático. Para usos em outras doenças também foi aprovado o Visudyne[®], um lipossoma contendo Veteporfina, para degeneração muscular. Além do uso para encapsular fármacos, a FDA também tem aprovado o uso de nanopartículas para diversas outras aplicações, como o Gastromark[®], uma nanopartícula de uso oral para diagnóstico por imagem; Definity[®], microesferas lipídicas para uso em contraste (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2016; BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015).

As nanopartículas são diversas e a escolha da mesma está baseada em sua aplicação, na molécula que irá encapsular e no alvo que deverá atingir. As principais nanopartículas são: (i) baseadas em lipídios: lipossomas e suas variações, nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanodispersões de cristais líquidos; (ii) baseadas em polímeros: nanoesferas, nanocapsulas, dendrímeros, micelas; nanopartículas

híbridas que podem conter parte lipídica e parte polimérica; (iii) inorgânicas: nanopartículas de prata, nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono, nanopartículas de sílica; entre muitas outras (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; CHEN, GUANYING *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2018; VENTOLA, 2017).

Uma outra denominação que as nanopartículas terapêuticas e de diagnósticos podem receber é (i) nanopartículas inorgânicas e (ii) orgânicas. As nanopartículas orgânicas incluem todas as de base lipídica e poliméricas, e estas exibem resultados promissores na clínica onde estão atualmente sendo desenvolvidas para aplicações amplas que vão desde a vacinação, hemostase, a sistemas de liberação de depósito de longa duração, a usos tópicos e transdêrmicos para entrega sistêmica através da pele (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2016; CHEN, GUANYING *et al.*, 2016).

As nanopartículas possuem o potencial para otimizar terapias já existentes ou introduzir novas opções terapêuticas. Além de carrear fármacos tradicionais, as nanopartículas já são utilizadas para carrear peptídeos, DNAs, RNAs, proteínas, anticorpos, moléculas naturais, entre outros. Além do uso para teranóstico, diagnóstico e biomarcadores (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2016; SHI *et al.*, 2017; WICKI *et al.*, 2015).

Em estudos pré-clínicos encontra-se uma infinidade de nanopartículas sendo estudadas, encapsulando diversos ativos e combinações deles, para o tratamento dos mais variados tipos de câncer (SHI *et al.*, 2017), destacando-se recentemente, a terapia multifuncional para câncer de próstata baseada em nanopartículas híbridas contendo paclitaxel e curcumina (YAN *et al.*, 2015); nanopartículas poliméricas sítio específicas (MASOOD, 2016); nanopartículas, micropartículas e nanoagregados para terapia de câncer de pulmão (ABDELAZIZ *et al.*, 2018); nanopartículas de bismuto para melhora de raio X para radioterapia do câncer de mama (DENG, JUNJIE *et al.*, 2017); nanopartículas de ouro contendo conjugados de fármacos e peptídeos com ação antitumoral (KALIMUTHU *et al.*, 2018) e nanopartículas poliméricas pH sensíveis para teranóstico de câncer (LIM; CHUNG; CHUNG, 2018).

1.6.1. Nanopartículas de base lipídica e suas aplicações na pele

Para usos na pele, seja tópico ou transdérmico, a forma, carga, e número de nanopartículas irá afetar sua interação com as células e absorção cutânea. E

fatores inerentes a pele, tais como, integridade, hidratação, oclusão, idade, também são fatores influentes. Ainda, os tipos de nanopartículas podem influenciar nos mecanismos de interação, permeação e retenção neste tecido. Nanopartículas lipídicas, por exemplo, dependendo da sua composição, podem interagir e se fundirem quando em contato com o EC, enquanto que as nanopartículas poliméricas mantêm suas características iniciais e acumulam principalmente nos anexos da pele. (CARTER; NARASIMHAN; WANG, 2018; HINDE *et al.*, 2017; LEMOS *et al.*, 2018; NAFISI; MAIBACH, 2018).

Lipossomas, são vesículas fosfolipídicas nas quais o núcleo é composto por uma solução aquosa bem definida e possui uma ou várias bicamadas lipídicas circundantes, tem uma composição semelhante à matriz lipídica do EC e membranas celulares. Portanto, eles interagem com EC e são capazes de desestabilizar a matriz lipídica, misturando ou fundindo-se com ela e consequentemente, aumentando o fluxo de fármacos na pele, podendo alcançar facilmente a derme e a circulação sistêmica (LEMOS *et al.*, 2018; PERALTA *et al.*, 2018).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram introduzidos em 1991 como um sistema de transporte na interface entre os sistemas lipídicos pré-existent (emulsões e lipossomas). As NLS possuem propriedades dos dois sistemas anteriores, são lipídios dispersos em água com sua estabilidade assegurada por tensoativo, assim como as emulsões, e exibem biocompatibilidades e controle de liberação, assim como os lipossomas. Além disso, eles também são interessantes devido à possibilidade de ampliar e passar por processo de esterilização. Devido à natureza lipídica, as NLS são consideradas eficientes carreadores de fármacos na pele, podendo interagir com os lipídios da matriz lipídica e adentrar o tecido facilmente (ROBERTS *et al.*, 2017; ROSA *et al.*, 2018; SALA *et al.*, 2018).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) por sua vez, são conhecidos como a segunda geração das NLS. Eles foram desenvolvidos por volta dos anos 2000 com o intuito de melhorar a liberação e encapsulação dos agentes, que era um problema nas NLS, pois, nestes sistemas, o lipídio sólido pode formar cristais perfeitos com o tempo de armazenamento, resultando em expulsão do conteúdo encapsulado. A diferença entre os CLN e as NLS é que este primeiro contém lipídio líquido e sólido em sua formulação, em contraste

com as NLS que contém apenas o lipídio sólido. A adição do lipídio líquido permitiu que a encapsulação e liberação dos ativos fosse mais eficiente (ROBERTS *et al.*, 2017; ROSA *et al.*, 2018; YINGCHONCHAROEN; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2016).

Como resultado da mistura de lipídios, a estrutura do lipídio sólido não se reorganiza, suficientemente para expulsar as moléculas de fármaco adicionadas, os cristais do lipídio sólido se tornavam desorganizados e mal estruturados, desta forma, mais moléculas de fármaco poderiam adentrar e serem aprisionadas nas nanoestruturas. Além disso a temperatura de fusão do lipídio diminuía, o que possibilita trabalhar com menores temperaturas (SALA *et al.*, 2018; YINGCHONCHAROEN; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2016).

Quanto a aplicação tópica de nanopartículas lipídicas (NLS e CLN), forma-se uma monocamada sobre a pele, devido a sua propriedade de adesividade. Esta monocamada é chamada de filme hidrofóbico, cuja resistência e os efeitos dependem do tamanho das partículas que o constituem. Este filme apresenta um efeito oclusivo devido a sua lipofilia, assim, perda de água natural da pele é impedida, proporcionando uma redução da compactação das células do EC, os corneócitos. O grau de penetração das nanopartículas lipídicas está relacionado com os lipídios que as compõe e ao seu tamanho, onde nanopartículas menores penetram mais interiormente e as interações lipídicas também proporcionam maior penetração (SALA *et al.*, 2018).

Zhai, *et al.* (2014) realizaram pesquisas baseadas na exploração da histopatologia da pele para elucidar o mecanismo de interação do CLN com a pele e observaram que o EC havia perdido sua organização original se tornando-se mais disperso e solto após a aplicação do CLN, fato este que aumentou a penetração do ativo nas camadas da pele (ZHAI; ZHAI, 2014).

Diversos estudos apontam os CLN como sistemas nanoparticulados apropriados para aplicação tópica e transdérmica, sendo os mesmos avaliados como pouco tóxicos, estáveis, quando comparado a outros sistemas, bem como, perfis de liberação sustentados de fármacos, capazes de encapsular fármacos hidrofílicos, além de seu uso em plataformas multifuncionais (BRUGÈ *et al.*, 2015; CHEN-YU *et al.*, 2012; CHEN, PING *et al.*, 2016; CHEN, YIYIN *et al.*, 2014; FERREIRA, MARA *et al.*, 2015; MENNINI *et al.*, 2016; OKONOGI;

RIANGJANAPATEE, 2015; QU *et al.*, 2015; TARATULA *et al.*, 2013; TIWARI; PATHAK, 2011).

1.6.2. Nanopartículas lipídicas como vetores de siRNA

Um vetor ideal para a carrear siRNAs até o núcleo das células alvos devem satisfazer a alguns requisitos como: complexar eficientemente o siRNA para protegê-lo do meio extracelular, promover a sua internalização celular e, uma vez no citoplasma, deve liberar efetivamente o siRNA (ROSA *et al.*, 2018).

Atualmente, os principais vetores de siRNA podem ser classificados em duas categorias: vetores virais e não virais. Os vetores virais consistem em vírus modificados/atenuados, porém com sua capacidade de invadir células intacta. Embora eficientes, eles podem ser fatalmente perigosos, pois induzem mutações e desencadeiam respostas imunes e inflamatórias. Os vetores não virais por sua vez, envolvem uma complexação do siRNA de interesse com compostos carregados positivamente que estejam presentes da estrutura, tais como polímeros, lipídios catiônicos, nanopartículas entre outros. Vetores não-virais são eleitos como pouco tóxicos e que não geram reações imunes (ROSA *et al.*, 2018; VICENTINI *et al.*, 2013).

Visando terapia gênica, a nanopartícula que mais se encontra nos ensaios clínicos para câncer, são os lipossomas (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2016). Entretanto, em ensaios pré clínicos e pesquisas científicas, outras nanopartículas de base lipídicas estão sendo estudadas para tratar não somente o câncer de pele, mas outras doenças de pele através do uso de siRNAs, tais como vitiligo, psoríase, acne, feridas, dermatites, inflamações cutâneas, entre outras (BORGHETI-CARDOSO *et al.*, 2017; DEPIERI *et al.*, 2016; PETRILLI *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2018; TOFANI *et al.*, 2018).

As nanopartículas lipídicas, tais como os CLN, penetram nas membranas biológicas de forma eficaz, assim são capazes de aumentar a absorção de material genético, tal como siRNAs. Nanopartículas lipídicas catiônicas são vetores de entrega de genes interessantes e adequados para a entrega sistêmica e cutânea por apresentaram alta capacidade de proteção, compatibilidade pelos tecidos, baixas toxicidades, além de maiores tempos de prateleira, visando usos futuros (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015; WAN; ALLEN; CULLIS, 2013).

A carga positiva destes sistemas interage com lipídios aniônicos das biomembranas produzindo uma desestabilização e consequentemente facilitam a entrega intracelular de macromoléculas, como DNA e RNA (WAN; ALLEN; CULLIS, 2013).

Um avanço para o uso de nanopartículas lipídicas como vetores de ácidos nucleicos, foi o desenvolvimento de lipídios ionizáveis, com pKa na região de 7 ou menor. Em valores de pH ácido, abaixo do pKa dos lipídios (por exemplo, pH 4), a carga fica positiva e permite a complexação com ácidos nucleicos como siRNAs. Em pH fisiológico, acima do pKa dos lipídios, estes adquirem uma carga de superfície quase neutra que reduz sua toxicidade. Os lípidos catiónicos ionizáveis também desempenham um papel importante estimulando a liberação do conteúdo endossomal, onde no pH ácido dos compartimentos endossomais, os lipídios adquirem uma carga positiva e podem interagir com os lipídios aniônicos dos endossomas, desestabilizando suas membranas e promovendo a liberação dos ácidos nucleicos. O primeiro lipídio catiônico ionizável desenvolvido foi o DODAP (1,2-dioleoil-3-dimetilamino propano), e mais tarde vieram seus derivados, tal como o DOTAP (2-Dioleoil 3-trimetilamônio propano) (WAN; ALLEN; CULLIS, 2013).

1.6.3. Plataformas multifuncionais para tratamento de câncer

O câncer é uma doença complexa, que envolve múltiplos caminhos moleculares e são marcados por diversas mutações e casos de resistências a fármacos. A inibição de apenas um caminho pode ser insuficiente para alcançar a remissão de determinados tumores. As combinações de quimioterápicos, visando efeito sinérgico, atacando diferentes vias da patogênese do câncer são utilizadas para elevar as chances tratamento. O uso destas combinações permite que menores doses de fármacos sejam usadas, diminuindo efeitos adversos e efeitos tóxicos (XU, XIAOYANG *et al.*, 2015).

Nanocarreadores tornam possível diminuir as doses bem como a administração concomitante de mais de um agente ativo. As plataformas multifuncionais permitem não só a combinação de dois ou mais fármacos, mas também, a combinação de fármacos convencionais e anticorpos, fármacos convencionais e RNAs de interferência, dois ou mais siRNAs entre outras possíveis combinações (BISWAS *et al.*, 2013; XU, XIAOYANG *et al.*, 2015).

Sistemas multifuncionais contendo fármacos e siRNAs para tratamento de doenças cutâneas já têm sido estudadas, *in vitro* e *in vivo*. Nanopartículas lipídicas encapsulando Erlotinib e siRNA IL36 foram avaliadas para tratar topicamente a psoríase (BOAKYE *et al.*, 2017). Visando também a terapia da psoríase, a combinação de siRNA TNF α e capsaisin foi realizada através de uma nanopartícula híbrida (DESAI *et al.*, 2013).

O câncer de pele é um alvo recorrente das terapias multifuncionais, e diversas combinações já foram reportadas, tais como recentemente, a combinação de resveratrol e quercetina em lipossomas (CADDEO *et al.*, 2016), siRNA STAT3 combinado a Imatinib em nanopartículas de ouro (LABALA; JOSE; VENUGANTI, 2016), curcumina combinada a siRNA STAT3 em lipossomas deformáveis (JOSE *et al.*, 2017).

Outros tipos de câncer também estão sendo alvo das combinações, como um promissor tratamento para gliomas baseados na combinação de um peptídeo com doxorubicina (LIU *et al.*, 2012) e um CLN contendo combinações de fármacos e siRNAs/miRNAs visa o tratamento de câncer de pulmão (TARATULA *et al.*, 2013).

As plataformas multifuncionais tem sido propostas para teranóstico, o qual, utilizando nanopartículas multifuncionais que levam concomitantemente até o tumor, tanto o agente de imagem para o diagnóstico, como o fármaco para o tratamento (BAO; MITRAGOTRI; TONG, 2013).

Face ao exposto, o desenvolvimento de carreadores lipídicos multifuncionais, onde associa-se a nanotecnologia, fármaco quimioterápico e a terapia gênica antisense, representa uma importante estratégia para o tratamento tópico do câncer de pele.

5. CONCLUSÃO

O Carreador lipídico nanoestruturado (CLN) foi desenvolvido com êxito e foi capaz de desempenhar seu papel de carrear o agente antitumoral 5FU e complexar com eficiência o siRNA BCL-2. Além disso, se mostrou estável e apresentou as propriedades de um sistema nanoparticulado. O CLN possibilitou a redução significativa da dose de 5FU, ainda se mostrou capaz de reter porcentagens, em relação a dose aplicada, similares ao produto comercial no tecido alvo, a pele. Desta forma, os efeitos adversos seriam minimizados, pois a absorção sistêmica se mostrou mínima.

O CLN com ambos os ativos separadamente, 5FU e siRNA BCL-2, se mostrou ativo contra as linhagens tumorais A431 e A375, apresentando certo grau de seletividade para as mesmas, em relação à linhagem normal. O CLN multifuncional apresentou índice de combinação satisfatório, mostrando que a ação do 5FU combinada ao siRNA BCL-2 não apenas se somam, mas são sinérgicas.

Os ensaios *ex vivo* demonstraram a capacidade do CLN de formar um filme lipídico oclusivo que poderá auxiliar numa futura aplicação do mesmo, além de demonstrar que a toxicidade ao tecido foi reduzida. A avaliação da atividade do CLN com os ativos separadamente e multifuncional se mostrou promissora, foi possível observar a função anti-proliferativa do 5FU, e houve eficiente inibição da proteína BCL-2 e outros membros anti-apoptóticos.

O conjunto de estudos realizados no presente trabalho culminou na obtenção de um nanocarreador para a co-administração de 5FU e siRNA BCL-2 para o tratamento tópico do câncer de pele, comprovando-se características adequadas de encapsulação e complexação, tamanho e carga superficial das nanopartículas, estabilidade, penetração cutânea, interação com células, atividade sinérgica dos fármacos e eficácia de sua atividade anti-proliferativa e antisense para a proteína BCL-2.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELAZIZ, Hadeer M *et al.* Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles , microparticles , nanocomposites and nanoaggregates. *Journal of Controlled Release*, v. 269, p. 374–392, 2018.
- ALAEDDINI, Adel; YANG, Kai; MURAT, Alper. ASRSM: A sequential experimental design for response surface optimization. *Quality and Reliability Engineering International*, v. 29, n. 2, p. 241–258, 2013.
- ALANAZI. F.K EL-BADRY M, MOWAFY H. A AND ALSARRA I. A., Yassin A E. Validated High-Performance Liquid Chromatographic Technique for Determination of 5-Fluorouracil: Applications to Stability Studies and Simulated Colonic Media. *Journal of Chromatographic Science*, v. 9, p. 558–563, 2009.
- AMADIO, Marialaura *et al.* Nanosystems based on siRNA silencing HuR expression counteract diabetic retinopathy in rat. *Pharmacological Research*, v. 111, p. 713–720, 2016.
- AMASYA, Gulin *et al.* Development of a HILIC method for the determination of 5-fluorouracil from nano drug delivery systems and rat skin extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 154, p. 285–293, 2018.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts and Figures 2018. *American Cancer Society*, v. 1, p. 1–72, 2018.
- ANDRADE, T. A. *et al.* Ex vivo model of human skin (hOSEC) as alternative to animal use for cosmetic tests. *Procedia Engineering*, v. 110, n. 16, p. 67–73, 2015.
- ANSELMO, Aaron C; MITRAGOTRI, Samir. Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, p. 10–29, 2016.
- ANVISA. Resolução De Diretoria Colegiada - RDC Nº 45, De 09 De Agosto De 2012. *Diário Oficial da União*, 2012.
- APALLA, Zoe *et al.* Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatology Practical & Conceptual*, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2017.
- ASHWANIKUMAR, N. *et al.* 5-Fluorouracil-lipid conjugate: Potential candidate for drug delivery through encapsulation in hydrophobic polyester-based nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 11, p. 4685–4694, 2014.
- BAI, Kelvin *et al.* Interference from Proteins and Surfactants on Particle Size Distributions Measured by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). *Pharmaceutical Research*, v. 34, n. 4, p. 800–808, 2017.
- BAKER, Matthew J. *et al.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, v. 9, n. 8, p. 1771–1791, 2014.
- BAO, Gang; MITRAGOTRI, Samir; TONG, Sheng. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v. 15, p. 253–271, 2013.

BAROLI, Biancamaria. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 99, n. 1, p. 21–50, 2010.

BARTON, Virginia *et al.* Nonmelanoma skin cancer and risk of all-cause and cancer-related mortality: A systematic review. *Arch Dermatol Res*, v. 309, n. 4, p. 243–251, 2018.

BEHZADI, Shahed *et al.* Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, v. 46, n. 14, p. 4218–4244, 2017.

BENGA, Gh. Basic studies on gene therapy of human malignant melanoma by use of the human interferon β gene entrapped in cationic multilamellar liposomes. *Applied Biochemistry*, v. 5, n. 4, p. 402–408, 2001.

BHARDWAJ, Santosh Kumar. A Review: HPLC Method Development and Validation. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 5, n. 4, p. 76–81, 2015.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 337–351, 2016.

BISWAS, Swati *et al.* Biomaterials Lipid modified triblock PAMAM-based nanocarriers for siRNA drug co-delivery. *Biomaterials*, v. 34, n. 4, p. 1289–1301, 2013.

BLANCO, Elvin; SHEN, Haifa; FERRARI, Mauro. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, v. 33, n. 9, p. 941–951, 2015.

BOAKYE, Cedar H.A. *et al.* Novel amphiphilic lipid augments the co-delivery of erlotinib and IL36 siRNA into the skin for psoriasis treatment. *Journal of Controlled Release*, v. 246, p. 120–132, 2017.

BONNER, James A. *et al.* Inhibition of STAT-3 Results in Radiosensitization of Human Squamous Cell Carcinoma. *Radiother Oncol*, v. 93, n. 3, p. 339–344, 2009.

BORGHETI-CARDOSO, Livia N. *et al.* In Situ Gelling Liquid Crystalline System as Local siRNA Delivery System. *Molecular Pharmaceutics*, v. 14, n. 5, p. 1681–1690, 2017.

BRUGÈ, Francesca *et al.* A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 495, n. 2, p. 879–885, 2015.

CADDEO, Carla *et al.* Effect of quercetin and resveratrol co-incorporated in liposomes against inflammatory / oxidative response associated with skin cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 513, n. 1–2, p. 153–163, 2016.

CAMACHO, Kathryn M. *et al.* DAFODIL: A novel liposome-encapsulated synergistic combination of doxorubicin and 5FU for low dose chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, v. 229, p. 154–162, 2016.

CARTER, Prerana; NARASIMHAN, Balaji; WANG, Qun. Biocompatible Nanoparticles and Vesicular Systems in Transdermal Drug Delivery for Various Skin Diseases. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018.

CAVALCANTI, S. M.T. *et al.* Optimization of nanostructured lipid carriers for Zidovudine delivery using a microwave-assisted production method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 122, p. 22–30, 2018.

CHEN-YU, Guo *et al.* Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. v. 430, p. 292–298, 2012.

CHEN, Guanying *et al.* Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem. rev.*, v. 116, n. 5, p. 2826–2885, 2016.

CHEN, Ping *et al.* Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Development of curcumin loaded nanostructured lipid carrier based thermosensitive in situ gel for dermal delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 506, p. 356–362, 2016.

CHEN, Yiyin *et al.* Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 455, p. 36–43, 2014.

CHENG, Xinwei *et al.* Lipid Nanoparticles Loaded with an Antisense Oligonucleotide Gapmer Against Bcl-2 for Treatment of Lung Cancer. *Pharmaceutical Research*, v. 3139, p. 310–320, 2017.

CHINEMBIRI, Tawona N. *et al.* Topical Delivery of 5-Fluorouracil from Pheroid™ Formulations and the In Vitro Efficacy Against Human Melanoma. *AAPS PharmSciTech*, v. 16, n. 6, p. 1390–1399, 2015.

CHOUDHARY, G S *et al.* MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K / AKT / mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death dis.*, v. 6, n. 1, p. e1593-12, 2015.

CHUGHTAI, Komal *et al.* Topical 5-Fluorouracil associated skin reaction. *Oxford Medical Case Reports*, v. 2017, n. 8, p. 145–146, 2017.

CHUST, Rafael Berbert. Introdução Cromatografia de Líquidos. *Boletim Sociedade Portuguesa De Química*, p. 43–54, 1990.

CORTESI, Rita *et al.* Nanostructured lipid carriers (NLC) for the delivery of natural molecules with antimicrobial activity: production, characterisation and in vitro studies. *Journal of Microencapsulation*, v. 34, n. 1, p. 63–72, 2017.

COSTA, Paulo Jorge Cardoso Da. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 2, p. 141–153, 2002.

D'SOUZA, Susan. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*, v. 2014, p. 1–12, 2014.

DAŁBROWSKA, A K; ROSSI, R M. The relationship between skin function, barrier

properties, and body dependent factors. *Skin Research and Technology*, v. 24, n. 2, p. 165–174, 2018.

DE MATTOS, Ana Cristina; KHALIL, Najeh Maissar; MAINARDES, Rubiana Mara. Development and validation of an HPLC method for the determination of fluorouracil in polymeric nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, n. 1, p. 117–126, 2013.

DENG, Jun *et al.* Biomedicine & Pharmacotherapy Long non-coding RNA OIP5-AS1 functions as an oncogene in lung adenocarcinoma through targeting miR-448 / Bcl-2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 98, p. 102–110, 2018.

DENG, Junjie *et al.* Tumor targeted, stealthy and degradable bismuth nanoparticles for enhanced X-ray radiation therapy of breast cancer. *Biomaterials*, v. 154, p. 24–33, 2017.

DEPIERI, Livia Vieira *et al.* RNAi mediated IL-6 in vitro knockdown in psoriasis skin model with topical siRNA delivery system based on liquid crystalline phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 105, p. 50–58, 2016.

DESAI, Pinaki R *et al.* Topical delivery of anti-TNF α siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation in vivo. *Journal of Controlled Release*, v. 170, n. 1, p. 51–63, 2013.

DESMET, Eline; VAN GELE, Mireille; LAMBERT, Jo. Topically applied lipid- and surfactant-based nanoparticles in the treatment of skin disorders. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 14, n. 1, p. 109–122, 2017.

DIDONA, Dario *et al.* Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. *Biomedicines*, v. 6, n. 1, p. 6, 2018.

DÖGE, Nadine *et al.* Assessment of skin barrier function and biochemical changes of ex vivo human skin in response to physical and chemical barrier disruption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 116, p. 138–148, 2017.

DOHERTY, Edward; PERL, Andras. Measurement of Mitochondrial Mass by Flow Cytometry during Oxidative Stress. *React Oxyg Species*, v. 4, n. 10, p. 275–283, 2018.

DOS SANTOS FILHO, Edvande Xavier *et al.* Chemopreventive effects of FITOPROT against 5-fluorouracil-induced toxicity in HaCaT cells. *Life Sciences*, v. 193, p. 300–308, 2018.

DOWDY, Steven F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nature Biotechnology*, v. 35, n. 3, p. 222–229, 2017.

DU, Bin *et al.* Preparation and passive target of 5-fluorouracil solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 15, n. 4, p. 346–353, 2010.

DUN, Jiening *et al.* Resveratrol synergistically augments anti-tumor effect of 5-FU *in vitro* and *in vivo* by increasing S-phase arrest and tumor apoptosis.

Experimental Biology and Medicine, v. 240, n. 12, p. 1672–1681, 2015.

EBERLE, Jürgen; HOSSINI, Amir M. Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma. *Current Genomics*, v. 9, n. 6, p. 409–419, 2008.

EL-HAMMADI, Mazen M. *et al.* Folic acid-decorated and PEGylated PLGA nanoparticles for improving the antitumour activity of 5-fluorouracil. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 516, n. 1–2, p. 61–70, 2017.

EMA. Guideline on bioanalytical method validation. *EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use*, v. 44, p. 1–23, 2012.

ESTEVA, Andre *et al.* Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*, v. 542, n. 7639, p. 115–118, 2017.

FDA. Application of Current Statutory Authorities to Human Somatic Cell Therapy Products and Gene Therapy Products. *Federal Register*, v. 58, n. 197, 1993.

FENG, Lan Fang *et al.* Bcl-2 siRNA induced apoptosis and increased sensitivity to 5-fluorouracil and HCPT in HepG2 cells. *Journal of Drug Targeting*, v. 14, n. 1, p. 21–26, 2006.

FERREIRA, Mara *et al.* Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with methotrexate : A tool for inflammatory and cancer therapy. *Int J Pharm*, v. 492, n. 1, p. 65–72, 2015.

FERREIRA, S. L C *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FILIPPE, Vasco; HAWES, Andrea; JISKOOT, Wim. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, n. 391, p. 806–811, 1998.

FOLDVARI, Marianna *et al.* Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *Journal of Controlled Release*, v. 240, p. 165–190, 2016.

FOUCQUIER, Julie; GUEDJ, Mickael. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research and Perspectives*, v. 3, n. 3, 2015.

FRADE, Marco Andrey Cipriani *et al.* Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 90, n. 3, p. 347–350, 2015.

GÂREA, S. A. *et al.* Porous clay heterostructures: A new inorganic host for 5-fluorouracil encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 491, n. 1–2, p. 299–309, 2015.

GELFUSO, Guilherme M; GRATIERI, Tais. Nanostructured lipid carriers for targeting drug delivery to the epidermal layer. *Therapeutic Delivery*, v. 4, n. 11, 2016.

GENG, Zhi Min *et al.* Bcl-2 gene silencing by RNA interference inhibits the growth of the human gallbladder carcinoma cell line GBC-SD in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, v. 30, n. 2, p. 793–800, 2013.

GLIGA, Anda R *et al.* Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells : the role of cellular uptake , agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol*, v. 11, n. 11, p. 1–17, 2014.

GUAN, Ai-jun Jiang; LI, Jiang Lian-tao. Curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human melanoma cells. *Mol Biol Rep*, v. 42, n. 1, p. 267–275, 2015.

HARTINGER, Jan *et al.* 5-fluorouracil Toxicity Mechanism Determination in Human Keratinocytes : in vitro Study on HaCaT Cell Line. *Prague Medical Report*, v. 11, n. 4, p. 128–138, 2017.

HARTINGER, Jan *et al.* The protective effect of pyrimidine nucleosides on human HaCaT keratinocytes treated with 5-FU. *Anticancer Research*, v. 35, n. 3, p. 1303–1310, 2015.

HAY, Roderick J. *et al.* The global burden of skin disease in 2010: An analysis of the prevalence and impact of skin conditions. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 134, n. 6, p. 1527–1534, 2014.

HEIDARI, Reza *et al.* Mechanism of valproic acid-induced Fanconi syndrome involves mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rat kidney. *Nephrology*, v. 23, n. 4, p. 351–361, 2018.

HEIDELBERGER, Charles *et al.* Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, v. 179, n. 4561, p. 663–666, 1957.

HERD, Heather *et al.* Nanoparticle uptake : The phagocyte problem. *Nano Today*, v. 10, n. 4, p. 487–510, 2015.

HINDE, Elizabeth *et al.* Pair correlation microscopy reveals the role of nanoparticle shape in intracellular transport and site of drug release. *Nature Nanotechnology*, v. 12, n. 1, p. 81–89, 2017.

HOSSEINKHANI, M. *et al.* Optimization of Wool Slenderizing Along with In-situ Synthesis of Silver Nanoparticles Using Box–Behnken Design. *Journal of Natural Fibers*, v. 14, n. 2, p. 175–184, 2017.

HSU, Shu-hao *et al.* Cationic Lipid Nanoparticles for Therapeutic Delivery of siRNA and miRNA to Murine Liver Tumor. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 9, n. 8, p. 1169–1180, 2013.

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Evaluation for stability data Q1E. *Harmonised Tripartite Guideline*, p. 19, 2003.

IEMSAM-ARNG, Jayanant *et al.* Modified NLC-loaded coumarin for

pharmaceutical applications: the improvement of physical stability and controlled release profile. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 21, n. 8, p. 1015–1022, 2016.

INCA. *Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil*, 2018.

IQBAL, Babar *et al.* Recent advances and development in epidermal and dermal drug deposition enhancement technology. *International Journal of Dermatology*, v. 57, n. 6, p. 646–660, 2018.

JAIN, Darshana *et al.* Studies on stabilization mechanism and stealth effect of poloxamer 188 onto PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 109, p. 59–67, 2013.

JAIN, Sanjay K. *et al.* Development and characterization of 5-FU bearing ferritin appended solid lipid nanoparticles for tumour targeting. *Journal of Microencapsulation*, v. 25, n. 5, p. 289–297, 2008.

JOHNSON, Lincoln V; WALSH, Marcia L; CHEN, L A N Bo. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123 *Cell Biology*: v. 77, n. 2, p. 990–994, 1980.

JORDAN, V Craig. A Retrospective: On Clinical Studies with 5-Fluorouracil. *cancer aacr journals*, v. 76, n. 4, p. 767–769, 2016.

JOSE, Anup *et al.* Effective Skin Cancer Treatment by Topical Co-delivery of Curcumin and STAT3 siRNA Using Cationic Liposomes. *AAPS PharmSciTech*, v. 19, n. 1, p. 166–175, 2017.

KAHRAMAN, Emine; GÜNGÖR, Sevgi; ÖZSOY, Yıldız. Potential enhancement and targeting strategies of polymeric and lipid-based nanocarriers in dermal drug delivery. *Therapeutic Delivery*, v. 8, n. 11, p. 967–985, 2017.

KALIMUTHU, Kalishwaralal *et al.* Gold nanoparticles stabilize peptide - drug - conjugates for sustained targeted drug delivery to cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*, p. 1–13, 2018.

KHALLAF, Rasha A.; SALEM, Heba F.; ABDELBARY, Ahmed. 5-Fluorouracil shell-enriched solid lipid nanoparticles (SLN) for effective skin carcinoma treatment. *Drug Delivery*, v. 23, n. 9, p. 3452–3460, 2016.

KISHI, Patrick; PRICE, Cynthia J. Life-Threatening Reaction with Topical 5-Fluorouracil. *Drug Safety - Case Reports*, v. 5, n. 1, p. 4, 2018.

KRIEG, Bettina *et al.* New techniques to assess in vitro release of siRNA from nanoscale polyplexes. *Pharmaceutical Research*, v. 32, n. 6, p. 1957–1974, 2015.

KRIVITSKY, Adva *et al.* Molecular weight-dependent activity of aminated poly(α)glutamates as siRNA nanocarriers. *Polymers*, v. 10, n. 5, p. 1–22, 2018.

KÜCHLER, Sarah *et al.* Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 377, n. 1–2, p. 169–172, 2009.

KUMAR, Sandeep R P *et al.* Clinical development of gene therapy : results and lessons from recent successes. *Molecular Therapy Methods Clin Dev*, v. 3, p. 1–11, 2016.

LABALA, Suman; JOSE, Anup; VENUGANTI, Venkata Vamsi Krishna. Transcutaneous iontophoretic delivery of STAT3 siRNA using layer-by-layer chitosan coated gold nanoparticles to treat melanoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 146, p. 188–197, 2016.

LAKKADWALA, Sushant; SINGH, Jagdish. Dual Functionalized 5-Fluorouracil Liposomes as Highly Efficient Nanomedicine for Glioblastoma Treatment as Assessed in an In Vitro Brain Tumor Model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 107, n. 11, p. 2902–2913, 2018.

LASOÑ, Elwira *et al.* NLC delivery systems for alpha lipoic acid: Physicochemical characteristics and release study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 532, n. 5, p. 57–62, 2017.

LASOÑ, Elwira *et al.* NLCs as a potential carrier system for transdermal delivery of forskolin. *Acta Biochim Pol*, v. 65, n. 3, p. 437–443, 2018.

LE, Van Minh *et al.* Enhanced anticancer efficacy and tumor targeting through folate-PEG modified nanoliposome loaded with 5-fluorouracil. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol*, v. 8, p. 1–8, 2017.

LEDDERHOF, Nicholas J. *et al.* Topical 5-Fluorouracil is a Novel Targeted Therapy for the Keratocystic Odontogenic Tumor. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 75, n. 3, p. 514–524, 2017.

LEMOS, Camila N *et al.* *Nanoparticles influence in skin penetration of drugs: In vitro and in vivo characterization*. Elsevier Inc., 2018.

LI, Li *et al.* Biomaterials Co-delivery of siRNAs and anti-cancer drugs using layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials*, v. 35, n. 10, p. 3331–3339, 2014.

LIM, Eun-kyung; CHUNG, Bong Hyun; CHUNG, Sang J. Recent Advances in pH-Sensitive Polymeric Nanoparticles for Smart Drug Delivery in Cancer Therapy. *Current Drug Targets*, v. 19, n. 4, p. 300–317, 2018.

LINDEN, RAfael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, p. 31–69, 2010.

LIU, Shuhuan *et al.* Biomaterials Gene and doxorubicin co-delivery system for targeting therapy of glioma. *Biomaterials*, v. 33, n. 19, p. 4907–4916, 2012.

LONG, Jianwen *et al.* MiR-219-5p Inhibits the Growth and Metastasis of Malignant Melanoma by Targeting BCL-2. *BioMed Research International*, v. 2017, 2017.

LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.

LOO, CH *et al.* Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. *International Journal of Nanomedicine*, v. 8, p. 13–22, 2013.

LOPES, Carla Martins; LOBO, José Manuel Sousa; COSTA, P. Modified release pharmaceutical forms: hydrophilic polymers. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LÓPEZ-GARCÍA, R.; GANEM-RONDERO, A. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Occlusive Effect and Penetration Enhancement Ability. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, v. 5, p. 62–72, 2015.

LOYAL, Jameson; ROMANO, Michael; PIERSON, Joseph C. Exuberant inflammatory reaction to occlusion of topical 5-fluorouracil (FU) under a continuous positive airway pressure (CPAP) mask: A warning to dermatologists and patients. *JAAD Case Reports*, v. 2, n. 3, p. 278–280, 2016.

LU, Hong-jie *et al.* Mechanism of MicroRNA-708 Targeting BAMBI in Cell Proliferation, Migration, and Apoptosis in Mice With Melanoma via the Wnt and TGF- β Signaling Pathways. *Technol Cancer Res Treat*, v. 17, n. 101, p. 1–15, 2018.

LUCENA, Flávia Raquel Santos *et al.* Induction of cancer cell death by apoptosis and slow release of 5-fluorouracil from metal-organic frameworks Cu-BTC. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 67, n. 8, p. 707–713, 2013.

MALCOLM, Dominic W. *et al.* The Effects of Biological Fluids on Colloidal Stability and siRNA Delivery of a pH-Responsive Micellar Nanoparticle Delivery System. *ACS Nano*, v. 23, n. 12, p. 187–197, 2018.

MAO, Shirui; WANG, Pu; BI, Dianzhou. Investigations on 5-fluorouracil solid lipid nanoparticles (SLN) prepared by hot homogenization. *Pharmazie*, v. 60, n. 4, p. 273–277, 2005.

MARÍN-SUÁREZ, Marta *et al.* Modelling the size and polydispersity of magnetic hybrid nanoparticles for luminescent sensing of oxygen. *Microchimica Acta*, v. 180, n. 13–14, p. 1201–1209, 2013.

MARTINS, Maria Rita Fernandes Morais; VEIGA, Francisco. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 1, p. 33–54, 2002.

MASOOD, Farha. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials Science & Engineering C*, v. 60, p. 569–578, 2016.

MENNINI, N *et al.* Comparison of liposomal and NLC (nanostructured lipid carrier) formulations for improving the transdermal delivery of oxaprozin: Effect of cyclodextrin complexation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 515, n. 1–2, p. 684–691, 2016.

MIRANDA DA COSTA, Carla Andréia; MORAES, Ângela Maria. Encapsulation of 5-fluorouracil in liposomes for topical administration. *Acta Scientiarum*

Technology, v. 25, n. 1, p. 53–61, 2003.

MIRJOLET, J-f *et al.* Bcl-2 / Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. v. 83, p. 1380–1386, 2000.

MISHRA, SHAILESH *et al.* Improvement of Drug Penetration through the Skin by Using Nanostructured Lipid Carriers (NLC). *International journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, v. 6, n. 3, p. 1–16, 2016.

MONTAGNA, Erik; LOPES, Otávio Sérgio. Molecular basis of basal cell carcinoma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 92, n. 4, p. 517–520, 2017.

MORALES-DUCRET, C. R. Jeanette *et al.* bcl-2 Expression in Primary Malignancies of the Skin. *Archives of Dermatological Research*, v. 131, p. 909–913, 1995.

MUKHERJEE, S.; RAY, S; THAKUR, R. S. Solid Lipid Nanoparticles : A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, p. 349–359, 2009.

MUTALIK, Srinivas *et al.* Enhancement in deposition and permeation of 5-fluorouracil through human epidermis assisted by peptide dendrimers. *Drug Delivery*, v. 21, n. 1, p. 44–54, 2014.

NAFISI, Shohreh; MAIBACH, Howard I. *Skin penetration of nanoparticles*. Elsevier Inc., 2018.

NAGHIBI BEIDOKHTI, Hamid Reza *et al.* Preparation, Characterization, and Optimization of Folic Acid-Chitosan-Methotrexate Core-Shell Nanoparticles by Box-Behnken Design for Tumor-Targeted Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, v. 18, n. 1, p. 115–129, 2017.

NAIR, Lekha *et al.* Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier , PLGA. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 1685–1697, 2011.

NASERI, Neda; VALIZADEH, Hadi; ZAKERI-MILANI, Parvin. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 5, n. 3, p. 305–313, 2015.

NASSIM, Mark Adel *et al.* An HPLC method for the measurement of 5-fluorouracil in human plasma with a low detection limit and a high extraction yield. *International journal of molecular medicine*, v. 10, n. 4, p. 513–516, 2002.

NELSON, Daniel D. *et al.* Compound Stability in Nanoparticles: The Effect of Solid Phase Fraction on Diffusion of Degradation Agents into Nanostructured Lipid Carriers. *Langmuir*, v. 33, n. 49, p. 14115–14122, 2017.

NICOLÒ, Amedeo De. Matrix effect management in liquid chromatography mass spectrometry : the internal standard normalized matrix effect. *Bioanalysis*, v. 9, n. 14, p. 1093–1105, 2017.

NIKOLAKIS, Georgios; MAKRANTONAKI, Evgenia; ZOUBOULIS, Christos C. *Experimental Models of Human Skin Aging*. Second Edition: Elsevier Inc., 2018.

NITA, M Eidi *et al.* 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer*, v. 78, n. 1 998, p. 986–992, 1998.

OKONOGI, Siriporn; RIANGJANAPATEE, Pornthida. Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 478, n. 2, p. 726–735, 2015.

OPFERMAN, Joseph T; KOTHARI, Anisha. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Nature Publishing Group*, v. 25, n. 1, p. 37–45, 2017.

PASCU, Mihail Lucian *et al.* 5-Fluorouracil as a Phosensitizer. *In vivo (Athens, Greece)*, v. 19, n. 1, p. 215–220, 2005.

PATEL, Meghavi N. *et al.* Characterization and Evaluation of 5-Fluorouracil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Prepared via a Temperature-Modulated Solidification Technique. *AAPS PharmSciTech*, v. 15, n. 6, p. 1498–1508, 2014.

PERALTA, Ma F *et al.* Liposomes can both enhance or reduce drugs penetration through the skin. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1–11, 2018.

PETRILLI, R. *et al.* Liquid crystalline nanodispersions functionalized with cell-penetrating peptides for topical delivery of short-interfering RNAs: A proposal for silencing a pro-inflammatory cytokine in cutaneous diseases. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 12, n. 5, p. 1063–1075, 2016.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; PASCHOAL, J. A.R.; *et al.* Quantification of 5-FU in skin samples for the development of new delivery systems for topical cancer treatment. *Pharmazie*, v. 73, n. 3, p. 133–138, 2018.

PETRILLI, R. *et al.* Cetuximab Immunoliposomes enhance Delivery of 5-FU to Skin Squamous Carcinoma Cells. *Anticancer Agents Med Chem.*, v. 17, n. 2, p. 301–308, 2017.

PETRILLI, R; ELOY, J; SAGGIORO, F; *et al.* Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. *Journal of Controlled Release*, v. 283, p. 151–162, 2018.

PRAÇA, Fabíola Silva Garcia *et al.* Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 111, p. 121–132, 2018.

QU, Chun Ying *et al.* Engineering of lipid prodrug-based, hyaluronic acid-decorated nanostructured lipid carriers platform for 5-fluorouracil and cisplatin combination gastric cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 3911–3920, 2015.

RAISOVA, Monika *et al.* The Bax/Bcl-2 Ratio Determines the Susceptibility of Human Melanoma Cells to CD95/Fas-Mediated Apoptosis. *J Invest Dermatol*, v. 117, n. 2, p. 333–340, 2001.

RAJINIKANTH, Paruvathanahalli Siddalingam; JESTIN, Chellian. Development

and evaluation of nanostructured lipid carrier-based hydrogel for topical delivery of 5-fluorouracil. *International Journal of Nanomedicine*, v. 11, p. 5067–5077, 2016.

RAYAVARAPU, Srinuvasarao; YARLA, Nagendra Sastry; KADIRI, Sunanda Kumari. Synthesis of Saccharumoside-B analogue with potential of antiproliferative and pro-apoptotic activities. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1–14, 2017.

ROBERTS, M. S. *et al.* Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release*, v. 247, p. 86–105, 2017.

ROHIT, Bhandari; PAL, Kaur Indu. A Method to Prepare Solid Lipid Nanoparticles with Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drugs. *Current Nanoscience*, v. 9, n. 2, p. 211–220, 2013

ROSA, J. *et al.* Current non-viral siRNA delivery systems as a promising treatment of skin diseases. *Current Pharmaceutical Design*, v. 24, n. 23, p. 2644–2663, 2018.

SAEDI, A. *et al.* Preparation and Characterization of Nanostructured Lipid Carriers as Drug Delivery System: Influence of Liquid Lipid Types on Loading and Cytotoxicity. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 47, n. 1, p. 1–33, 2018.

SAFWAT, Mohamed A. *et al.* Gold nanoparticles enhance 5-fluorouracil anticancer efficacy against colorectal cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 513, n. 1–2, p. 648–658, 2016.

SALA, M. *et al.* Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 535, n. 1–2, p. 1–17, 2018.

SALATIN, Sara; MALEKI, Solmaz; KHOSROUSHAHI, Ahmad Yari. Effect of the surface modification , size , and shape on cellular uptake of nanoparticles Abbreviations : *Cell Biology International*, v. 39, n. 8, p. 881–890, 2015.

SANSON, Ananda Lima *et al.* Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 2, p. 363–371, 2011.

SARETT, Samantha M; NELSON, Christopher E; DUVALL, Craig L. Technologies for Controlled , Local Delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release*, v. 28, n. 2018, p. 94–113, 2016.

SATO, Yusuke *et al.* Neutralization of negative charges of siRNA results in improved safety and efficient gene silencing activity of lipid nanoparticles loaded with high levels of siRNA. *Journal of Controlled Release*, v. 28, n. 284, p. 179–187, 2018.

SERASINGH, Madhavika N. *et al.* Anti-apoptotic BCL-2 proteins govern cellular outcome following B-RAFV600E inhibition and can be targeted to reduce resistance. *Oncogene*, v. 34, n. 7, p. 857–867., 2015.

SHABIR, Ghulam A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. *Journal of chromatography. A*, v. 14, n. 987, p. 57–66, 2003.

SHAH, M *et al.* Solid Lipid Nanoparticles of a Water Soluble Drug , Ciprofloxacin Hydrochloride. *Indian J Pharm Sci*, v. 74, n. 5, p. 434–442, 2012.

SHASTRI, Divyesh H. Effective Delivery Routes and Strategies for Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). *Current Pharmaceutical Design*, v. 23, n. 43, p. 6592–6601, 2018.

SHEN, B. B. *et al.* Fabrication and potential application of a di-functional magnetic system: Magnetic hyperthermia therapy and drug delivery. *CrystEngComm*, v. 18, n. 7, p. 1133–1138, 2016.

SHERING, Anto *et al.* Formulation of 5-fluorouracil loaded chitosan nanoparticles by emulsion droplet coalescence method for cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutical & Biological*, v. 2, n. 3, p. 926–931, 2011.

SHI, Jinjun *et al.* Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, v. 17, n. 1, p. 20–37, 2017.

SIDDALINGAM, Rajinikanth; CHIDAMBARAM, Kumarappan. Topical nano-delivery of 5-fluorouracil: Preparation and characterization of water-in-oil nanoemulsion. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 11, p. 2311–2319, 2016.

SIEPMANN, Juergen; PEPPAS, Nicholas A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 418, n. 1, p. 6–12, 2011.

SILVA, Filomena S.G. *et al.* Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. *Current Protocols in Toxicology*, v. 24, n. 2, p. 1–15, 2016.

SIMÕES, M. C.F.; SOUSA, J. J.S.; PAIS, A. A.C.C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Letters*, v. 357, n. 1, p. 8–42, 2015.

SUBUDHI, M Biswaranjan *et al.* Eudragit S100 Coated Citrus Pectin Nanoparticles for Colon Targeting of 5-Fluorouracil. *Materials Basel*, v. 8, n. 3, p. 832–849, 2015.

SUN, Jing *et al.* Delivery Pathway Regulation of 3',3"-Bis-Peptide-siRNA Conjugate via Nanocarrier Architecture Engineering. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, v. 10, n. 2, p. 75–90, 2018.

SWEENEY, Larissa *et al.* Antiangiogenic Antibody Improves Melanoma Detection by Fluorescently Labeled Therapeutic Antibodies. *Laryngoscope*, v. 126, n. 12, p. 1–17, 2017.

TALARI, Abdullah Chandra Sekhar *et al.* Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 52,

n. 5, p. 456–506, 2017.

TARATULA, Oleh *et al.* Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA. *Journal of Controlled Release*, v. 171, n. 3, p. 349–357, 2013.

TAYLOR, F J Guild A J Kinloch A C. Particle cavitation in rubber toughened epoxies : the role of particle size. *Journal of Materials Sciences*, v. 45, n. 14, p. 3882–3894, 2010.

TIWARI, Radheshyam; PATHAK, Kamla. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 415, n. 1–2, p. 232–243, 2011.

TOFANI, Larissa Bueno *et al.* In Vitro TyRP-1 Knockdown Based on siRNA Carried by Liquid Crystalline Nanodispersions : an Alternative Approach for Topical Treatment of Vitiligo. *Pharmaceutical Research*, v. 35, n. 5, p. 104–109, 2018.

TUMMALA, Shashank; SATISH KUMAR, M. N.; PRAKASH, Ashwati. Formulation and characterization of 5-Fluorouracil enteric coated nanoparticles for sustained and localized release in treating colorectal cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 3, p. 308–314, 2015.

TYAGI, Nikhil *et al.* Development and Characterization of a Novel in vitro Progression Model for UVB-Induced Skin Carcinogenesis. *Scientific Reports*, v. 5, p. 1–11, 2015.

TZANAKIS, I *et al.* Ultrasonics Sonochemistry Characterizing the cavitation development and acoustic spectrum in various liquids. *Ultrasonics - Sonochemistry*, v. 34, p. 651–662, 2017.

UM, Hong-duck. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis : a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species PRO-SURVIVAL PRO-SURVIVAL. *Oncotarget*, v. 7, n. 5, p. 5193–5203, 2015.

VENTOLA, C Lee. Progress in Nanomedicine : Approved and Investigational Nanodrugs Progress in Nanomedicine : *P.T.*, v. 42, n. 12, p. 742–755, 2017.

VERHAEGEN, Monique E. *et al.* Merkel Cell Carcinoma Dependence on Bcl-2 Family Members for Survival. *journal invest dermatol*, v. 134, n. 8, p. 2241–2250, 2014.

VERHAEGH, M.E.J.M. *et al.* Expression of the apoptosis-suppressing protein Bcl-2 in non-melanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology*, p. 740–744, 1995.

VICENTINI, Fabiana Testa Moura De Carvalho *et al.* Delivery systems and local administration routes for therapeutic siRNA. *Pharmaceutical Research*, v. 30, n. 4, p. 915–931, 2013.

VOGLER, Meike. Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours.

Advances in Medicine, v. 2014, p. 1–14, 2014.

WAN, C; ALLEN, T M; CULLIS, P R. Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *Drug Deliv. and Transl. Res.*, p. 1–10, 2013.

WANG, Gary X *et al.* DNp63 Inhibits Oxidative Stress-Induced Cell Death, Including Ferroptosis, and Cooperates with the BCL-2 Family to Promote Clonogenic Survival. *CellReports*, v. 21, n. 10, p. 2926–2939, 2017.

WANG, Jian-ming *et al.* Effect of targeted magnetic nanoparticles containing 5-FU on expression of bcl-2 , bax and caspase 3 in nude mice with transplanted human liver cancer. v. 13, n. 23, p. 3171–3175, 2007.

WANG, Jianmin; WANG, Huiyun; XIA, Qiang. Ubidecarenone-loaded nanostructured lipid carrier (UB-NLC): Percutaneous penetration and protective effects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on HaCaT cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 7, 2018.

WICKI, Andreas *et al.* Nanomedicine in cancer therapy: Challenges , opportunities , and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, v. 200, p. 138–157, 2015.

WILLIAMS, Ashbel C. Topical 5-FU-A New Approach to Skin Cancer. *ann of surgery*, v. 173, n. 3, p. 864–870, 1971.

WITAYAUDOM, Pimchanok; KLINKESORN, Utai. Effect of surfactant concentration and solidification temperature on the characteristics and stability of nanostructured lipid carrier (NLC) prepared from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) kernel fat. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 505, p. 1082–1092, 2017.

WITTRUP, Anders; LIEBERMAN, Judy. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*, v. 16, n. 9, p. 543–552, 2016.

WON, Young Wook *et al.* Poly(oligo-D-arginine) with internal disulfide linkages as a cytoplasm-sensitive carrier for siRNA delivery. *Molecular Therapy*, v. 19, n. 2, p. 372–380, 2011.

WU, Xin *et al.* A strategy using mesoporous polymer nanospheres as nanocarriers of Bcl-2 siRNA towards breast cancer therapy. *J. Mater. Chem. B*, v. 1, p. 2–4, 2019.

XU, Weilin *et al.* The impact of particles on the collapse characteristics of cavitation bubbles. *Ocean Engineering*, v. 131, p. 15–24, 2017.

XU, Xiaoyang *et al.* Cancer nanomedicine : from targeted delivery to combination therapy. *Trends in Molecular Medicine*, p. 1–10, 2015.

YAN, Jieke *et al.* Targeted nanomedicine for prostate cancer therapy : docetaxel and curcumin co-encapsulated lipid – polymer hybrid nanoparticles for the enhanced anti-tumor activity in vitro and in vivo Targeted nanomedicine for prostate cancer therapy : docetaxel and cur. *Drug Delivery*, p. 1–6, 2015.

YASSIN, Alaa Eldeen B. *et al.* Optimization of 5-fluorouracil solid-lipid

nanoparticles: A preliminary study to treat colon cancer. *International Journal of Medical Sciences*, v. 7, n. 6, p. 398–408, 2010.

YINGCHONCHAROEN, Phatsapong; KALINOWSKI, Danuta S; RICHARDSON, Des R. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy : What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacol Rev*, v. 68, n. 3, p. 701–787, 2016.

YUAN, G U. Determination of 5-Fluorouracil in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Transactions of Tianjin Univesity*, v. 16, n. 3, p. 167–173, 2010.

YUAN, Hong *et al.* Strategic approaches for improving entrapment of hydrophilic peptide drugs by lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 70, n. 2, p. 248–253, 2009.

ZHAI, Yingjie; ZHAI, Guangxi. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 10, n. 193, p. 90–99, 2014.

ZHANG, Lili *et al.* Autophagy in human skin squamous cell carcinoma: Inhibition by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced chemotherapy sensitivity. *Oncology Reports*, v. 34, n. 6, p. 3147–3155, 2015.

ZOU, Ying *et al.* Confocal laser scanning microscopy to estimate nanoparticles human skin penetration in vitro. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 8035–8041, 2017.