

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**ISABELLA LUIZ SUZUKI**

**Nanopartículas híbridas polímero-lipídicas associadas à  
internalização fotoquímica para liberação de siRNA na terapia  
tópica da psoríase**

Ribeirão Preto  
2020

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**ISABELLA LUIZ SUZUKI**

**Nanopartículas híbridas polímero-lipídicas associadas à  
internalização fotoquímica para liberação de siRNA na terapia  
tópica da psoríase**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e  
cosméticos

**Orientador(a): Profa. Dra. Maria Vitória  
Lopes Badra Bentley**

Ribeirão Preto  
2020

## RESUMO

SUZUKI, I. L. **Nanopartículas híbridas polímero-lipídicas associadas à internalização fotoquímica para liberação de siRNA na terapia tópica da psoríase.** 2020. 108f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A psoríase é uma doença inflamatória crônica que apresenta aumento da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), uma citocina pró-inflamatória. Com a descoberta do RNAi, mediado pelo siRNA, foi possível eliminar a expressão de genes de interesse. No entanto, para sua aplicação, é necessário o uso de carreadores que possam proteger e liberar o siRNA nas células-alvo. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas híbridas polímero-lipídicas (NPLs) como sistema de liberação para o siRNA, utilizando a internalização fotoquímica como ferramenta para otimizar o escape endossomal, através do encapsulamento do fotossensibilizador TPPS2a, visando uma formulação para terapia tópica da psoríase. Para o desenvolvimento da formulação de NPLs foi aplicado o *Quality by Design*. As NPLs foram compostas pelo lipídio Compritol® 888 ATO (2,0%), Poloxamer 188 (1,5%) e pelo polímero catiônico polialilamina hidrocloreto (PAH) (0,10%). O TPPS2a foi encapsulado na formulação, originando a formulação NPL-TPPS2a, com uma eficiência de encapsulação de 99%. As nanopartículas apresentaram um tamanho médio de 142 nm, para formulação NPL, e de 253nm, para NPL-TPPS2a, e potencial zeta positivo, para ambas. A avaliação do comportamento e ação *in vitro* das NPL e NPL-TPPS2a foi estudada em queratinócitos e fibroblastos, evidenciando que o tratamento, nas concentrações adequadas, não diminuiu a viabilidade celular e teve alta captação celular verificada por citometria de fluxo (acima de 80%) e por microscopia confocal. Nos estudos *in vitro* permeação e retenção com siRNA Alexa647 em peles de suínos, foi quantificado e mostrando a presença do siRNA e do TPPS2a nas camadas da pele nos tratamentos com a formulação NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647. O ensaio *in vivo* em camundongos foi feito de acordo com o modelo de psoríase utilizando o creme IMQ. A eficácia de silenciamento da citocina TNF $\alpha$  *in vivo* foi avaliada por ELISA e histologia da pele, os resultados demonstraram que o siRNA TNF $\alpha$  quando veiculado pela formulação NPL-TPPS2a com irradiação (internalização fotoquímica) obteve o melhor resultado, com baixos níveis de TNF $\alpha$ , redução do rubor e da descamação da pele dos camundongos. Face aos resultados obtidos, pode-se concluir que as formulações desenvolvidas (NPL e NPL-TPPS2a) associadas a internalização fotoquímica do TPPS2a demonstraram ser sistemas de eficazes para administração e liberação de siRNA para a terapia tópica da psoríase.

Palavras-chave: siRNA. Terapia tópica. Nanopartículas híbridas polímero-lipídicas. Terapia gênica. Internalização fotoquímica. Psoríase.

# ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Terapia gênica com interferência por RNA (*RNA interference* - RNAi)

A terapia gênica é um procedimento que envolve a introdução de material genético dentro da célula, com o objetivo de regular, reparar, substituir, adicionar, deletar ou silenciar genes identificados como prejudiciais ao funcionamento adequado do organismo, por isso é utilizada como tratamento de determinadas doenças (WIRTH; PARKER; YLA-HERTTUALA, 2013). Seu conceito básico envolve a entrega de ácidos nucleicos para células-alvo para alteração na produção de determinada proteína específica, levando a alterações na sua expressão e, como consequência, a um benefício terapêutico. Os genes são responsáveis por uma grande parte das doenças humanas, seja pela ausência de codificação, pela codificação em excesso de determinadas proteínas, ou pela codificação de proteínas anormais, o que os torna alvos importantes para o tratamento das doenças. Assim, a terapia gênica surge como uma nova ferramenta promissora no desenvolvimento de novas terapias (VERMA; WEITZMAN, 2005; MARTIMPREY *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2013; IBRAHEEM; ELAISSARI; FESSI, 2014). Embora os desafios e riscos associados a esse tipo de terapia sejam grandes, todo o conhecimento adquirido com estudos vem permitindo a proposição de terapias mais efetivas, dentre elas as que envolvem o silenciamento de genes (NABEL, 2004).

O silenciamento de genes pode ser realizado em dois níveis: em nível transcricional, baseado na manipulação de sequências gênicas pela inserção de mutações em regiões específicas do gene, produzindo assim, proteínas truncadas ou com domínios não funcionais; ou em nível pós-transcricional, baseado na repressão da expressão gênica, que ocorre por causa da degradação do RNA mensageiro (RNAm) (CAPECCHI, 1989; SCHERER; ROSSI, 2003; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011).

No início da década de 1990, foi descrito pela primeira vez o processo de silenciamento gênico pós-transcricional pelos grupos de Richard Jorgensen e Joseph Mol, enquanto tentavam intensificar a coloração púrpura de petúnias por meio da introdução de múltiplas cópias do gene envolvido na produção da pigmentação. O resultado se deveu ao silenciamento tanto do gene exógeno (inserido) quanto do gene endógeno, e esse fenômeno foi denominado “cossupressão”. (JORGENSEN *et al.*,

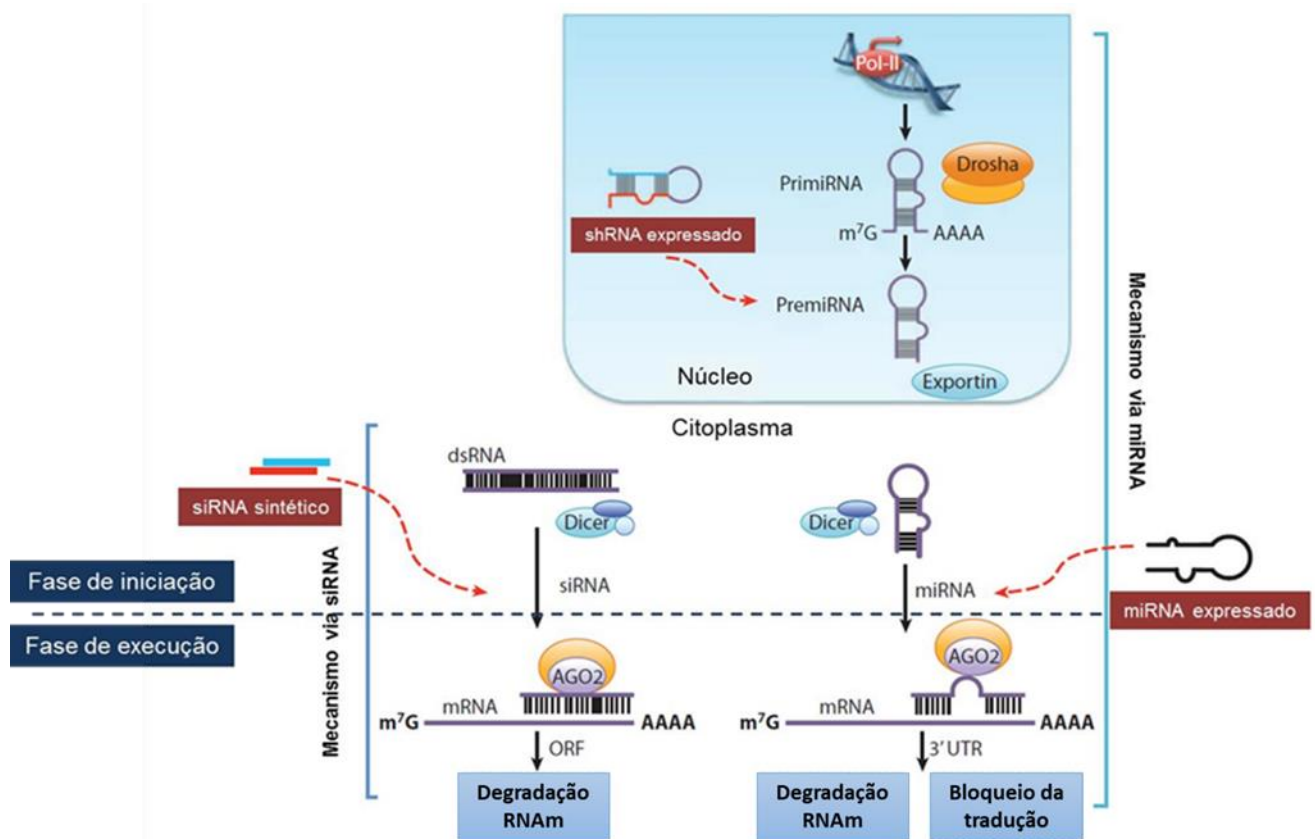
1996; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011; VAN DER KROL *et al.*, 1990).

Na mesma época, Guo e Kemphues estudavam a função do gene *par-1* no nemátodo *Caenorhabditis elegans* utilizando fitas de RNA *antisense* e RNA *sense* (controle negativo) e observaram a inibição da produção da proteína *par-1* com a utilização de ambas as fitas separadamente (GUO; KEMPHUES, 1995). No mesmo período, o grupo de Andrew Fire e Craig Mello obteve resultados similares aos de Guo e Kemphues com a injeção, separadamente, das fitas de RNA *sense* e *antisense* em nemátodos. Porém, eles observaram que, injetando as fitas *sense* e *antisense* juntas, RNA de fita dupla (dsRNA, do inglês *double strand RNA*), o resultado era muito mais efetivo em produzir a interferência do que com cada fita isolada. Esse processo no qual uma dupla fita de RNA é capaz de inibir a expressão de um gene ficou conhecido como Interferência por RNA (RNAi) (FIRE *et al.*, 1998; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011).

Com a descoberta da RNAi em *C. elegans*, juntamente com os resultados das pesquisas de Elbashir e colaboradores, em 2001, em que duplas fitas de 21 nucleotídeos de RNA sintéticas foram capazes de promover o silenciamento gênico em células de mamíferos (ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001), desencadeou-se uma revolução biotecnológica. A RNAi tornou-se um importante tema de interesse não apenas como uma ferramenta para a pesquisa, mas também como uma promessa na terapia gênica para o silenciamento de genes causadores de doenças, aplicando-se para as doenças em que a redução ou supressão do produto de um gene alvo específico poderia resultar em benefícios terapêuticos (GUO *et al.*, 2010).

O mecanismo de RNAi (Figura 1) pode ser didaticamente dividido em duas fases: a fase de iniciação, a qual consiste na geração ou introdução de moléculas efetoras, que podem ser classificadas em relação a sua origem e função em ao menos três categorias: *small interfering RNA* (siRNA), *microRNA* (miRNA) e *short hairpin RNA* (shRNA); e a fase de execução, na qual as moléculas efetoras são incorporadas em complexos proteicos denominados *RNA Induced Silencing Complex* (RISC), e ocorre a promoção do silenciamento gênico (GELEY; MÜLLER 2004; DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007a).

Figura 1 – Mecanismo de interferência por RNA (RNAi)



Fonte: adaptado de Huang e Liu, 2011.

O siRNA é um RNA de fita dupla curta com 21 a 23 ácidos nucleicos, com sequência totalmente complementar ao RNA mensageiro (RNAm) alvo e exógeno. Ele é gerado no citoplasma das células pela clivagem de dsRNA pela enzima Dicer em pequenos nucleotídeos (21-23 bases). A geração do miRNA inicia-se no núcleo onde os miRNA primários (pri-RNA) codificados endogenamente são processados em precursor miRNA (pre-miRNA), de aproximadamente 70 pares de bases. Esses pre-miRNA são transportados para o citoplasma, onde são clivados pela enzima Dicer gerando miRNA de cerca de 22 nucleotídeos. Na fase de execução, após a geração das moléculas efetoras, estas são incorporadas a proteínas celulares formando um complexo chamado RISC, do qual há participação da proteína Argonauta 2 (Ago 2). Essa proteína é responsável pela seleção da fita do siRNA ou miRNA que será incorporada ao complexo RISC, e também apresenta atividade de endonuclease dirigida contra a fita de RNAm alvo. Uma helicase presente nesse complexo abre a dupla fita do siRNA, então a fita *sense* é eliminada, e a fita *antisense* guia o complexo

até o RNAm alvo. Como a sequência de bases do siRNA é perfeitamente complementar à sequência de bases do RNAm alvo, o complexo RISC consegue degradar o RNA através da sua clivagem. Por outro lado, o miRNA tem normalmente uma sequência imperfeita de bases nitrogenadas, o que leva ao silenciamento gênico sem a degradação do RNAm (NOVINA; SHARP, 2004; DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007b; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; HUANG; LIU, 2011).

Muitas pesquisas envolvendo RNAi têm mostrado potencial para tratar diversas doenças, incluindo desordens da pele (JACOBSON *et al.*, 2010; VICENTINI *et al.*, 2013a, TOFANI *et al.*, 2018, VIEGAS *et al.*, 2020), aterosclerose (LI *et al.*, 2010), câncer (RAMÍREZ-MOYA *et al.*, 2020; CHALBATANI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2018) e infecções virais (ALVAREZ *et al.*, 2009; ZAMORA *et al.*, 2011). O RNAi apresenta algumas vantagens sobre a terapia convencional com fármacos, que envolve o uso de pequenas moléculas ou proteínas. A principal vantagem é que em princípio qualquer alvo pode ser inibido, podendo alcançar e silenciar proteínas que não são facilmente bloqueadas por fármacos convencionais por apresentarem conformações não acessíveis a esses fármacos. Além disso, o siRNA é específico e consegue bloquear a expressão somente da proteína de interesse (alvo), ao passo que com um fármaco convencional, devido à similaridade estrutural entre algumas proteínas, o bloqueio não específico pode acontecer (BUMCROT *et al.*, 2006; DAKA; PEER, 2012). Outra vantagem é que a molécula de siRNA apresenta aproximadamente as mesmas características físico-químicas, o que facilita o desenvolvimento de formulação farmacêutica para a sua aplicação clínica, permitindo, assim, que, independentemente da sequência de siRNA usada, os mesmos requisitos para uma formulação ideal. Além disso, trata-se de uma molécula com produção sintética relativamente fácil (BUMCROT *et al.*, 2006).

Atualmente existem 37 estudos clínicos em andamento envolvendo o uso terapêutico do siRNA, administrado por diversas vias – intranasal, transdérmica, intravítrea, subcutânea e intravenosa –, para diversas doenças: hepatite crônica, doenças cardiovasculares, hemofilia A e B, diferentes tipos de câncer, entre outras. Os estudos se encontram em diferentes fases – fase 1, fase 2, fase 3 ou até mesmo fase de recrutamento de pessoas –, e metade desses testes envolve algum sistema de liberação para o siRNA (SAW; SONG, 2020). Esses estudos mostram que é fundamental o desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração localizada ou sistêmica do siRNA de forma segura e eficaz. Em outubro de 2018,



ocorreu um grande marco para a história envolvendo terapia com RNAi, pois foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) a primeira terapêutica com siRNA, o Onpattro (Patisiran), usado para o tratamento da amiloidose transtiretina hereditária, doença rara caracterizada pelo acúmulo anormal de uma proteína chamada amiloide nos órgãos e tecidos do corpo. Os sintomas dependem de onde a proteína amiloide se acumula (SAW; SONG, 2020).

Apesar das vantagens e benefícios em potencial, as características físico-químicas do siRNA são um dos principais desafios para a sua aplicação terapêutica. Embora isso seja um obstáculo a ser superado, é menos desafiador do que as terapias baseadas em DNA, que são moléculas maiores e precisam alcançar o núcleo (DAVID *et al.*, 2010). Uma das principais barreiras à entrada do siRNA para o interior das células é a membrana plasmática, que possui uma estrutura dinâmica com característica lipofílica e grupos fosfato aniônicos. Por conta dessas características, ela acaba restringindo a entrada de moléculas grandes, hidrofílicas e eletricamente carregadas (aniônicos), como as moléculas de RNA, dificultando esse processo de passagem (ALIABADI *et al.*, 2012; XU, GANESH, AMIJI, 2012; CHONG *et al.*, 2013). Outro desafio está relacionado à estabilidade das moléculas de siRNA em fluidos biológicos (OZCAN *et al.*, 2015). Quando veiculados na forma livre, possuem curta meia-vida (aproximadamente 30 minutos) devido à ação quase que instantânea das enzimas RNase A que degradam as moléculas (GUZMAN-VILLANUEVA *et al.*, 2014). Algumas estratégias utilizadas para melhorar a estabilidade do siRNA *in vivo* envolvem: modificações químicas nos grupamentos fosfodiéster, que reduzem a especificidade da nuclease; e proteção física por meio de sistemas de liberação, que impedem o acesso da nuclease ao siRNA (MARTÍNEZ; JIMÉNEZ; PAÑEDA, 2015).

Considerando os obstáculos na utilização terapêutica do siRNA, e sabendo que o sucesso dessa terapia é dependente de um eficiente carregamento e liberação para que haja a expressão do agente terapêutico nas células-alvo nos tecidos ou órgãos, o desenvolvimento de um sistema de liberação adequado para a veiculação do siRNA é apontado como fator-chave para sua utilização terapêutica: um sistema que possa proteger sua degradação, limitar sua eliminação precoce e que seja capaz de liberá-lo nas células para efetivo silenciamento (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; KREBS; ALSBERG, 2011).

## 1.2. Sistemas de liberação para veiculação de siRNA

Dentre os desafios para a aplicação terapêutica do siRNA estão sua instabilidade no corpo, sua ineficiente internalização celular e seu difícil escape endossomal, mesmo quando é internalizado no interior das células (SCHROEDER *et al.*, 2010). Portanto, é necessário o desenvolvimento de um sistema capaz de superar esses obstáculos. Um sistema de liberação ideal para a administração de siRNA deve apresentar algumas características, como:

- a) ultrapassar as barreiras inerentes de cada via de administração, como, por exemplo, o estrato córneo (EC) da pele (CEVC; VIERL, 2010);
- b) ligar-se às moléculas de siRNA promovendo proteção contra degradação enzimática;
- c) facilitar a captação do siRNA pelas células, uma vez que ele é incapaz de se difundir passivamente pelas membranas celulares devido à repulsão eletrostática (carga negativa do siRNA com a bicamada lipídica);
- d) promover o escape endossomal liberando o conteúdo no citoplasma celular antes da metabolização do siRNA;
- e) ser inerte e não estimular uma resposta imunológica no organismo;
- f) liberar as moléculas de siRNA intactas no citoplasma para um eficiente silenciamento gênico (PECOT *et al.*, 2011; ZHANG; MCINTOSH; GRINSTAFF, 2012; FOLDVARI *et al.*, 2015).

Os sistemas de liberação podem ser classificados em dois grupos – virais ou não virais –, e são selecionados de acordo com sua segurança e biocompatibilidade para se obter uma alta eficiência de transfecção gênica (REISCHL; ZIMMER, 2009). Os vetores virais são conhecidos pela alta eficiência na transfecção de genes. Consistem em modificações de vírus a fim de torná-los incapazes de se autorreplicar e de causar alguma doença, porém, sua capacidade de transferir material genético para as células é mantida (DENG *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2014). Embora sua eficiência de transfecção seja alta, esses vetores apresentam riscos relacionados às reações imunes e tóxicas, além de possível recombinação viral, sendo assim, a falta de total garantia de segurança para seu uso se torna um obstáculo (REISCHL; ZIMMER, 2009).

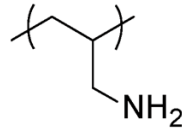
Os sistemas de liberação não virais normalmente são formados por complexos de polímeros e/ou lipídios catiônicos e siRNA. Essa classe foi desenvolvida para

oferecer alternativas aos vetores virais para a veiculação de genes e é cuidadosamente formulada para evitar o estímulo do sistema imunológico, como também para ultrapassar as barreiras da absorção, distribuição e tráfego intracelular. São sistemas promissores devido a sua segurança, à possibilidade de direcionamento para diferentes alvos celulares por meio de modificações estruturais e à fácil síntese (REISCHL; ZIMMER, 2009; GAO; HUANG, 2013; YIN *et al.*, 2014; FOLDVARI *et al.*, 2015).

Os lipídios e polímeros catiônicos formam complexos com siRNA através de interações eletrostáticas de sua carga positiva com a carga negativa do siRNA, formando os lipoplexos e os poliplexos, respectivamente. As interações eletrostáticas devem ser estáveis para sustentar a complexação do ácido nucleico com o lipídio ou polímero catiônico durante todo seu transporte até a célula-alvo, isto é, devem proteger de degradação e promover sua internalização celular. Essa complexação do siRNA com o carreador catiônico evita problemas de repulsão pela membrana celular e diminui o tamanho dos ácidos nucleicos devido à condensação da molécula (BEYERLE *et al.*, 2011; GÜNTHER *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; SCHROEDER *et al.*, 2010). O siRNA também pode ser conjugado com moléculas pequenas, como o colesterol e anticorpos. Junto a essas alternativas, há também possibilidades de veiculação do siRNA em líquidos iônicos (DHARAMDASANI *et al.*, 2020), em cristais líquidos (BORGHETI-CARDOSO *et al.* 2017), em nanopartículas, como lipossomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, dentre outras, os quais vêm apresentando resultados promissores na promoção da captação celular e silenciamento gênico em diferentes linhagens celulares e tecidos (YIN *et al.*, 2014; ZHOU; ZHANG; LIANG, 2014; FOLDVARI *et al.*, 2015, CAVALLARO *et al.*, 2017; ROSA *et al.*, 2018; VIEGAS *et al.*, 2020).

Dentre os polímeros carregados positivamente que podem ser empregados na construção de carreadores não virais, está a polialilamina hidrocloreada (PAH). A PAH é um polímero sintético hidrossolúvel com elevado residual de carga positiva devido aos grupamentos amino protonáveis (Figura 2) (ALHADDAD *et al.*, 2012). Este polímero apresenta alta capacidade de se complexar com ácidos nucleicos por meio de interações eletrostáticas; além disso, promove a condensação da sua estrutura, diminuindo o seu tamanho, e também neutraliza a carga negativa, favorecendo a entrada dos ácidos nucleicos na célula através da membrana celular (GÜNTHER *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2010).

Figura 2 - Estrutura molecular do polímero catiônico PAH



PAH

Fonte: Yoshida *et al.*, 2018.

Esses complexos formados entre o polímero catiônico PAH e o siRNA são denominados poliplexos. Nanopartículas preparadas com esse tipo de polímero, devido a sua carga positiva, favorecem a interação com o exterior da membrana plasmática, conduzindo à sua internalização pelo processo de endocitose (BRUNO, 2011). A endocitose pode ser mediada por clatrina, que é a via preferencial de poliplexos (ALHADDAD *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2014). Esse processo pode levar à degradação lisossômica do siRNA (FERREIRA *et al.*, 2014). Por isso, torna-se necessário focar em alguma estratégia para aumentar o escape endossomal para que a liberação desses ácidos nucleicos no citoplasma celular ocorra, etapa limitante para a obtenção de um silenciamento gênico (ALHADDAD *et al.*, 2012; BRUNO, 2011).

Ainda em relação aos carreadores não virais, sistemas baseados em lipídios foram desenvolvidos para administração de siRNA. Variações na composição dos lipídios e nas propriedades estruturais das nanopartículas permitem a entrega específica do siRNA e a sua liberação após a internalização celular (KAPOOR; BURGESS; PATIL, 2012). As nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) são sistemas baseados em componentes que são lipídios sólidos a temperatura ambiente, que apresentam baixa citotoxicidade, possibilitam a obtenção de nanopartículas sem o uso de solventes e são aprovados para aplicação farmacológica em seres humanos. Além disso, são passíveis de esterilização, e sua produção pode ser feita em larga escala, o que é de interesse para produção industrial (CARVALHO *et al.*, 2013; MANDAL *et al.*, 2013; MÜLLER *et al.*, 2000).

Com o objetivo de aproveitar as vantagens da utilização de PAH, e concomitantemente, das NLSs na terapia gênica, foi proposta uma síntese de

nanopartícula lipídica sólida associada ao polímero catiônico PAH. Esses sistemas são denominados nanopartículas híbridas polímero-lipídicas, e podem ser utilizados para liberação de siRNA (WU, 2016).

### **1.3. Nanopartículas híbridas polímero-lipídicas (NPLs)**

As nanopartículas híbridas polímero-lipídicas são um sistema nanométrico emergente de administração de fármacos, que possui como componentes polímeros e lipídios, apresentando vantagens de ambos os materiais. As NPLs se encontram na forma sólida à temperatura corpórea, assim como as NLSs, porém, diferentemente destas, não são partículas essencialmente lipídicas, assim como os lipossomas; também não são partículas essencialmente poliméricas, como as nanopartículas poliméricas (WU, 2016; HADINOTO; SUNDARESAN; CHEOW, 2013). As NPLs apresentam vantagens em comparação a outros sistemas de carreadores, devido a sua ampla seleção de polímeros e lipídios e suas combinações híbridas. Podem ser obtidas por processos versáteis para apresentar nanoestruturas modificáveis e possuem maior capacidade de carregar múltiplos agentes terapêuticos (ZHANG *et al.*, 2017).

A coexistência, no mesmo material, de polímeros e lipídios que possuem propriedades diferentes, como hidrofobicidade e solubilidade em água, confere essa capacidade versátil às NPLs de encapsular diversos tipos de compostos. Dentre as vantagens apresentadas pelas NPLs, em relação a outros tipos de nanocarreadores, estão:

- a) ampla seleção de polímeros e lipídios biocompatíveis e inúmeras combinações lipídico-poliméricas;
- b) produção relativamente fácil
- c) maior capacidade de coencapsular mais de um agente terapêutico.

Além disso, o sistema pode apresentar uma porção polimérica capaz de encapsular fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis e fornecer estruturas robustas, e uma porção lipídica que pode proporcionar uma blindagem biocompatível, passível de modificações na superfície da partícula, funcionando como uma barreira e evitando que o fármaco encapsulado escape (CHEOW; HADINOTO, 2011). Muitas moléculas bioativas podem ser encapsuladas, adsorvidas ou ligadas de forma covalente nesse sistema híbrido, como fármacos, genes, proteínas e moléculas com atividade

funcionalizadora. Entre os polímeros mais escolhidos estão: o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), a policaprolactona (PCL), o dextrano ou a albumina, por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e uso prévio em produtos aprovados. Entre os lipídios mais utilizados, estão geralmente os lipídios conjugados ao polietilenoglicol (PEG), ácidos graxos, lecitina, fosfolipídios zwitteriônicos, catiônicos, aniônicos e neutros, como a lecitina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamônio-propano (DPTAP), 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) ou 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-hosocetanolâmina (DOPE) (ZHANG *et al.*, 2016; MANDAL *et al.*, 2013).

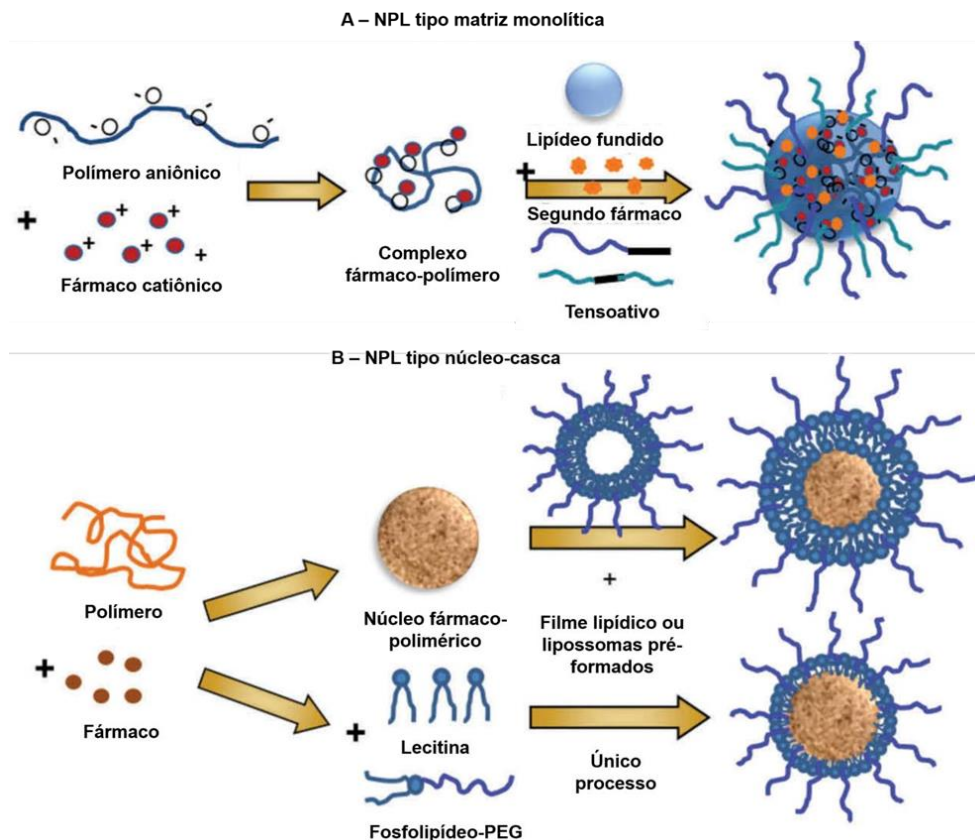
No início dos anos 2000, as primeiras NPLs foram relatadas, e esse sistema despertou interesse de pesquisadores que queriam solucionar problemas relacionados com a encapsulação de fármacos iônicos hidrossolúveis em matriz lipídica e procuravam uma alternativa para que esses princípios ativos fossem encapsulados adequadamente e apresentassem liberação sustentada (WONG *et al.*, 2004). Desde então, formulações de NPLs têm sido desenvolvidas para encapsulação de quimioterápicos (ZHANG *et al.*, 2016; SENDEL-TURK; HASCICEK, 2017; TAHIR *et al.*, 2019), antibióticos (CHEOW; HADINOTO, 2011); coencapsulação de quimioterápico e quimiossensibilizador (WONG *et al.*, 2006); coencapsulação com efeito sinérgico de dois quimioterápicos (LI *et al.*, 2017; PRASAD *et al.*, 2013); terapia anti-hepatite B usando vitamina E (HAMDI *et al.*, 2020); bupivacaína para anestesia local (MA *et al.*, 2017); nicotina para tratar dependência química (ZHAO *et al.*, 2017), e também as moléculas biologicamente ativas para terapia gênica e imunoterapia, incluindo siRNA (SHI *et al.*, 2014; WANG; GRIFFEL; XU, 2017; MONIRINASAB *et al.*, 2018). É descrito que as NPLs aumentaram a eficiência de encapsulação, a liberação controlada, a absorção e a captação de fármacos quando comparadas aos nanocarreadores lipídicos ou poliméricos isolados (ZHANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

As formulações de NPL podem ser divididas em duas principais categorias (Figura 3) (MANDAL *et al.*, 2013; WU, 2016):

- a) com matriz monolítica, em que o polímero e os fármacos são distribuídos de forma homogênea na matriz lipídica sólida; também conhecidas como nanopartículas mistas lipídico-poliméricas (CHAUDHARY *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2016; PRASAD *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2006).

b) com núcleo-casca, em que o núcleo polimérico contendo fármaco é coberto por uma camada de fosfolípido; também conhecidas como nanopartículas lipídico-poliméricas (HADINOTO; SUNDARESAN; CHEOW, 2013; SHI *et al.*, 2014).

Figura 3 - Ilustração esquemática da estrutura e preparação dos dois principais tipos de NPLs. (I) matriz monolítica e (II) núcleo-casca



Fonte: adaptado de Wu, 2016.

Nas NPLs de matriz monolítica, geralmente são utilizados polímeros aniônicos ou catiônicos que se complexam com fármacos de carga oposta aumentando a eficiência de encapsulação da partícula. Para a doxorrubicina HCl ou verapamil HCl, que são fármacos catiônicos, por exemplo, pode ser utilizado um polímero aniônico, como o sulfato de dextrana ou o polímero de óleo de soja, para neutralizar a carga do fármaco e assim incorporá-lo na matriz lipídica. Para produzir esse tipo de nanopartícula, métodos como microemulsificação a quente empregando alto cisalhamento por meio de Ultra-Turrax ou Ultrassom de ponta são empregados, utilizando pouco ou nenhum solvente orgânico. Em caso de coencapsulação, os fármacos podem ser não iônicos ou hidrofóbicos (MANDAL *et al.*, 2013; WU, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

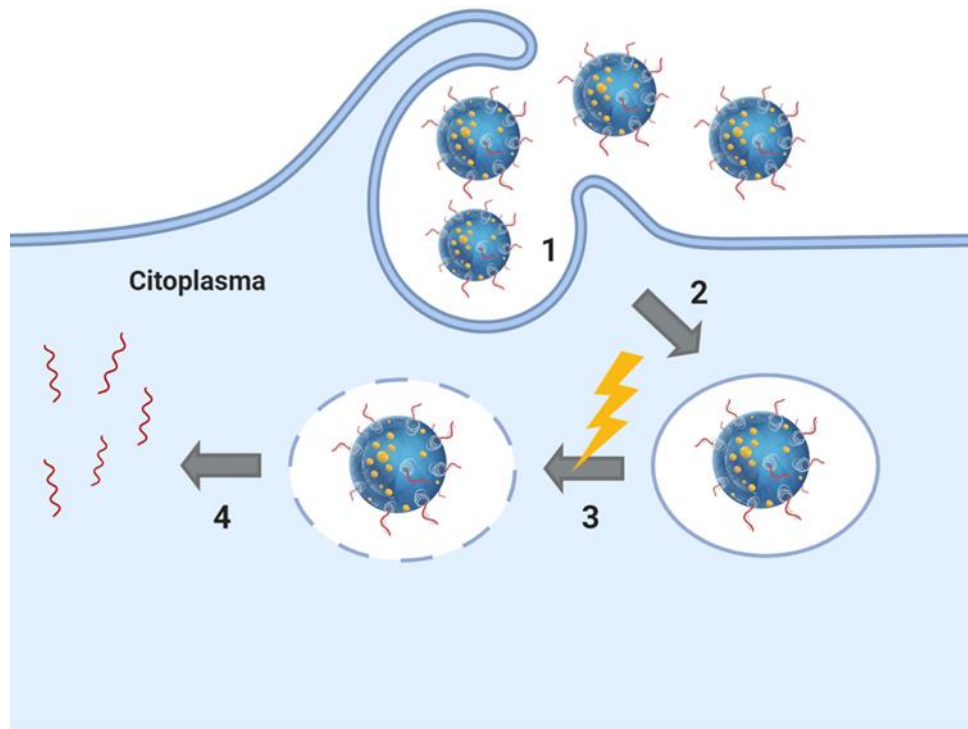
As NPLs de núcleo-casca possuem a vantagem do núcleo polimérico para liberação do fármaco sustentada e da camada (mono ou bi) lipídica semelhante à superfície lipossomal. As cadeias de PEG também podem ser conjugadas na superfície para obtenção de nanopartículas furtivas. Os métodos normalmente aplicados para a preparação dessas NPLs envolvem duas etapas: primeiro, o polímero (PLGA, por exemplo) e o fármaco são solubilizados juntos em um solvente orgânico, e por evaporação do solvente tem-se a formação do núcleo polimérico contendo o fármaco encapsulado. A segunda etapa é a mistura desse núcleo com filme lipídico ou lipossomas pré-formados para formar as bicamadas lipídicas (MANDAL *et al.*, 2013; WU, 2016). Há também descrita a produção dessas partículas em um só processo, a nanoprecipitação (MA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017). A maioria das formulações de NPL relatadas é obtida por métodos de preparação simples, utilizando-se de polímeros, lipídios e tensoativos já empregados em produtos farmacêuticos aprovados, ou considerados como seguros, o que torna esse tipo de sistema de liberação atrativo para o desenvolvimento de plataformas que possam alcançar uma terapia eficaz e segura para uso clínico.

#### **1.4. Internalização fotoquímica**

A internalização fotoquímica (*photochemical internalization*, PCI) foi desenvolvida em um hospital norueguês como um método para melhorar o efeito terapêutico de macromoléculas e outras moléculas que se acumulam nas vesículas endocíticas (SELBO *et al.*, 2010). O mecanismo de ação (Figura 4) dessa tecnologia é baseado na utilização de um composto fotossensível, um fotossensibilizador (FS), e no seu acúmulo no interior das vesículas endossomais juntamente com o fármaco ou gene de interesse. Através da ativação do FS com uma fonte de luz no comprimento de onda específico do ativo, ocorre excitação do FS e, subsequentemente, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singleto ( $O_3$ ), que são altamente oxidantes, podendo ocasionar danos aos componentes celulares. No entanto, a curta faixa de ação e a curta vida útil confinam o efeito prejudicial ao local de produção dessas espécies. Esse efeito localizado induz a ruptura das vesículas endocíticas, liberando, assim, as moléculas terapêuticas aprisionadas no citosol da célula-alvo (BERG *et al.*, 2007).



Figura 4 - Mecanismo da internalização fotoquímica no escape endossomal



Fonte: elaborado pela autora.

1) Entrada do siRNA e do FS. 2) Formação da vesícula endossomal no interior da célula. 3) Escape endossomal por internalização fotoquímica por meio da ativação por luz. 4) Liberação do siRNA no citoplasma celular.

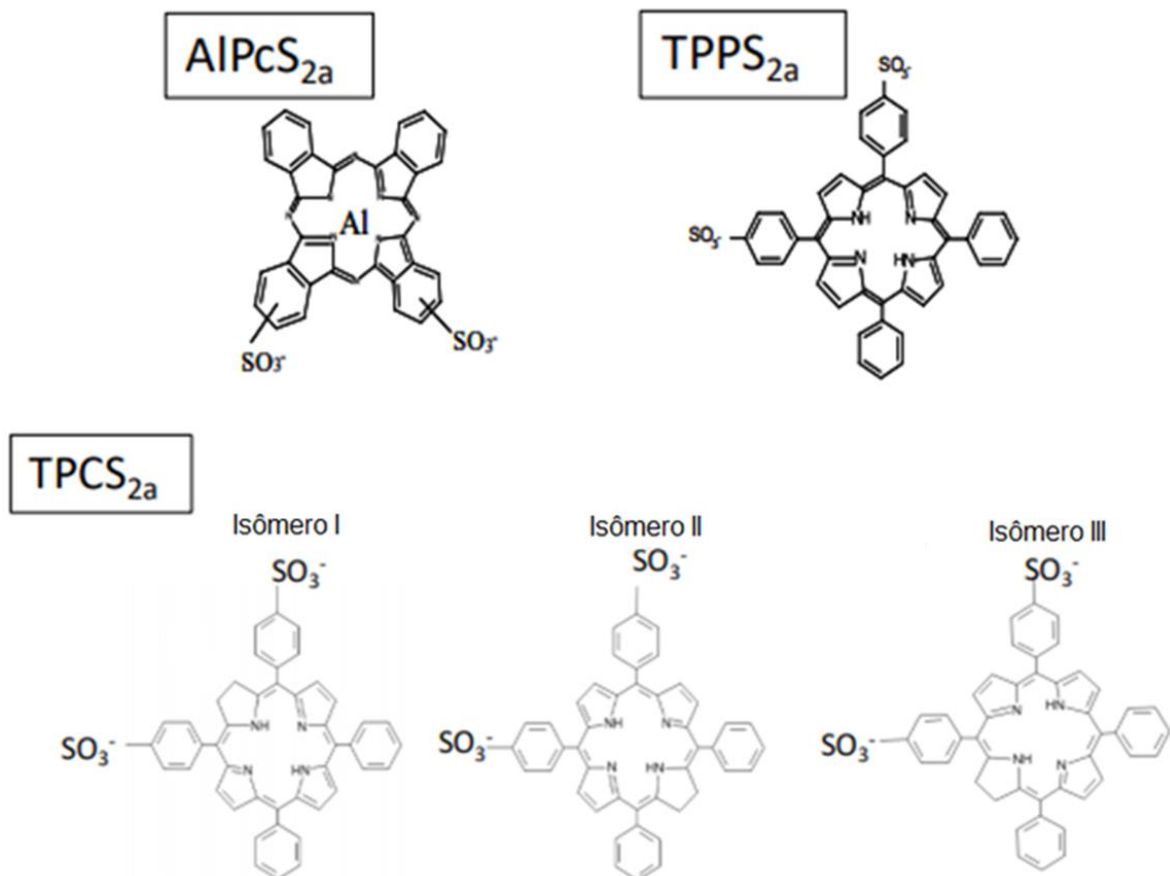
Após a exposição à luz, as EROs e o oxigênio singleto são formados nas membranas endossomais, onde o conteúdo de oxigênio é maior, fortalecendo o impacto nessas membranas que são o alvo principal desses produtos formados. O oxigênio singleto gerado permeabiliza as membranas endossomais, e o conteúdo interno dessas vesículas, incluindo os fármacos ou genes aprisionados, é liberado no citoplasma. Na ausência do tratamento fotoquímico, os fármacos ou genes de interesse permanecem aprisionados nos endossomas, sendo degradados posteriormente por enzimas (JERJES *et al.*, 2020).

A internalização fotoquímica foi apresentada pela primeira vez em 1999 como uma nova tecnologia para a entrega de uma variedade de moléculas terapêuticas no citosol (BERG *et al.*, 1999). Desde então, estudos e pesquisas publicadas demonstraram que essa técnica pode ser usada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (OLIVEIRA *et al.*, 2008), para a entrega específica de macromoléculas, como proteínas e peptídeos (BERG *et al.*, 1999), peptídeos conjugados a ácidos nucleicos

(SHIRAIISHI; NIELSEN, 2006), DNA plasmidial (KLOECKNER *et al.*, 2004), siRNA (IQBAL; TOUHID, 2011) e fármacos antineoplásicos (BAGLO *et al.*, 2014).

Os FSs devem ser atóxicos e somente apresentar atividade quando ativados com a luz em seu comprimento de onda específico (no espectro de absorção do FS). Os FSs mais eficientes usados nessa técnica têm uma estrutura anfifílica, pois tendem a se acumular no interior das vesículas endossomais. As estruturas dos principais FSs relevantes e mais utilizados para essa técnica estão apresentadas na Figura 5, embora outros FSs também possam provocar o mesmo efeito (JERJES *et al.*, 2020).

Figura 5 - Principais fotossensibilizadores utilizados na internalização fotoquímica



Fonte: adaptado de Jerjes *et al.*, 2020.

Os FSs anfifílicos usados na internalização fotoquímica, como TPCS<sub>2a</sub>, TPPS<sub>2a</sub> e AIPcS<sub>2a</sub>, tendem a ficar fortemente ligados às membranas das vesículas endossomais. Poucas enzimas, residentes na matriz dessas vesículas, são oxidadas pelo tratamento fotoquímico, embora alguma inativação já tenha sido relatada em

doses maiores de luz. Os FSs que não são fortemente ligados às membranas endossomais podem desativar as enzimas lisossômicas, bem como o fármaco ou gene endocitado, entre outras moléculas, que podem ser oxidadas direta ou indiretamente (BERG; MOAN, 1994).

A entrada dos FSs nas células pode ser diretamente através da membrana plasmática ou por vias endocíticas. A captação através da membrana plasmática pode ocorrer por difusão simples ou facilitada ou por um mecanismo de transporte ativo. A endocitose pode ocorrer por fagocitose, endocitose mediada por receptor (mediada por clatrina), pinocitose ou endocitose adsortiva (JERJES *et al.*, 2020). Na terapia gênica, uma das principais vias de endocitose é a captação celular mediada por clatrina. Estudos com nanopartículas de quitosana captadas pela via clatrina mostraram uma melhora na expressão gênica quando a internalização fotoquímica foi utilizada com este sistema, sendo uma via importante para esse tipo de terapia (GARAIOVA *et al.*, 2012).

O uso da internalização fotoquímica não ocorre apenas no campo da pesquisa básica, também já alcançou a parte clínica. Um novo FS, o TPCS2a (cloreto de tetrafenil dissulfonado), foi desenvolvido (BERG *et al.*, 2011) para uso clínico e caracterizado em relação às suas propriedades biológicas e fotoquímicas. Seu nome comercial é Fimaporfin, enquanto a formulação clínica é denominada Amphinex<sup>®</sup>, na qual o Fimaporfin é solubilizado em Tween80, manitol e tampão (JERJES *et al.*, 2020).

O primeiro estudo feito em humanos foi realizado pela University College London, em 22 pacientes com neoplasias avançadas (recorrentes e/ou metastáticas). O estudo foi projetado e implementado para avaliar a segurança e a tolerância da internalização fotoquímica induzida por TPCS2a com bleomicina como agente quimioterápico (fase 1 de estudos pré-clínicos). Os resultados mostraram que o tratamento com o quimioterápico associado à internalização fotoquímica induzida por TPCS2a foi excelente, além de o FS ter se mostrado seguro e tolerável por todos os pacientes (SULTAN *et al.*, 2016).

Para estabelecer a internalização fotoquímica na clínica, não há necessidade de um alto investimento em equipamentos, basta um *laser* ou uma lâmpada para a ativação do FS. As novas gerações de *lasers* de diodo são de baixo custo, compactas, portáteis, fáceis de usar e confiáveis (SELBO *et al.*, 2001; WOODHAMS *et al.*, 2010; BERG *et al.*, 2005).

Este projeto contou com a colaboração do Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato e do grupo de Óptica do IFSC (Instituto de Física de São Carlos, USP) nas etapas envolvendo os processos fotoquímicos.

### 1.5. Psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, imunomediada, que se manifesta na pele e/ou articulações afetando cerca de 2 a 5% da população mundial. Na pele, essa doença é caracterizada por aparecimento de placas eritematosas, proliferação anormal e acelerada de queratinócitos que levam a hiperplasia epidérmica, infiltração de linfócitos T ativados e dilatação dos capilares sanguíneos. Está associada a significantes comorbidades, incluindo depressão, hipertensão, diabetes, dentre outras, e afeta a qualidade de vida dos pacientes devido ao desconforto físico, imagem negativa do corpo, limitações nas atividades diárias, contatos sociais e de trabalho (RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014; LI; ARMSTRONG, 2012; JAKOBSEN *et al.*, 2009).

A apresentação clínica dessa doença varia muito, podendo ser classificada como leve, com manchas isoladas, ou como extensa, com placas confluentes envolvendo diversas áreas do corpo. A psoríase vulgar, ou em placas, é o subtipo mais comum, afetando 80 a 90% dos pacientes. Outros subtipos de psoríase incluem gutata, pustulosa, inversa e eritrodérmica (LI; ARMSTRONG, 2012).

O diagnóstico da psoríase é baseado na apresentação clínica do paciente, necessitando eventualmente de biópsia da pele para confirmação. As principais alterações observadas na epiderme são a acantose, aumento do número de queratinócitos e espessamento da camada espinhosa; perda da camada granular; paraceratose, uma disfunção do processo de cornificação que mantém queratinócitos nucleados na camada córnea; e hiperkeratose, caracterizada pelo espessamento da camada córnea. Ao mesmo tempo, ocorre na derme um aumento da quantidade e a dilatação de vasos sanguíneos, o que permite maior migração de células imunológicas aos locais afetados, mantendo, assim, o ciclo da doença ativo (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; KRUEGER; BOWCOCK, 2005).

A psoríase é considerada uma doença etiológica multifatorial, na qual influências ambientais e fatores genéticos levam a disfunção imunocelular, que é responsável pelo quadro inflamatório. As citocinas e quimiocinas possuem um papel

importante nesse quadro característico da doença, pois são as responsáveis pelo recrutamento de linfócitos e manutenção do processo inflamatório. A pele psoriática é também caracterizada por um aumento da angiogênese (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; SARRA *et al.*, 2011).

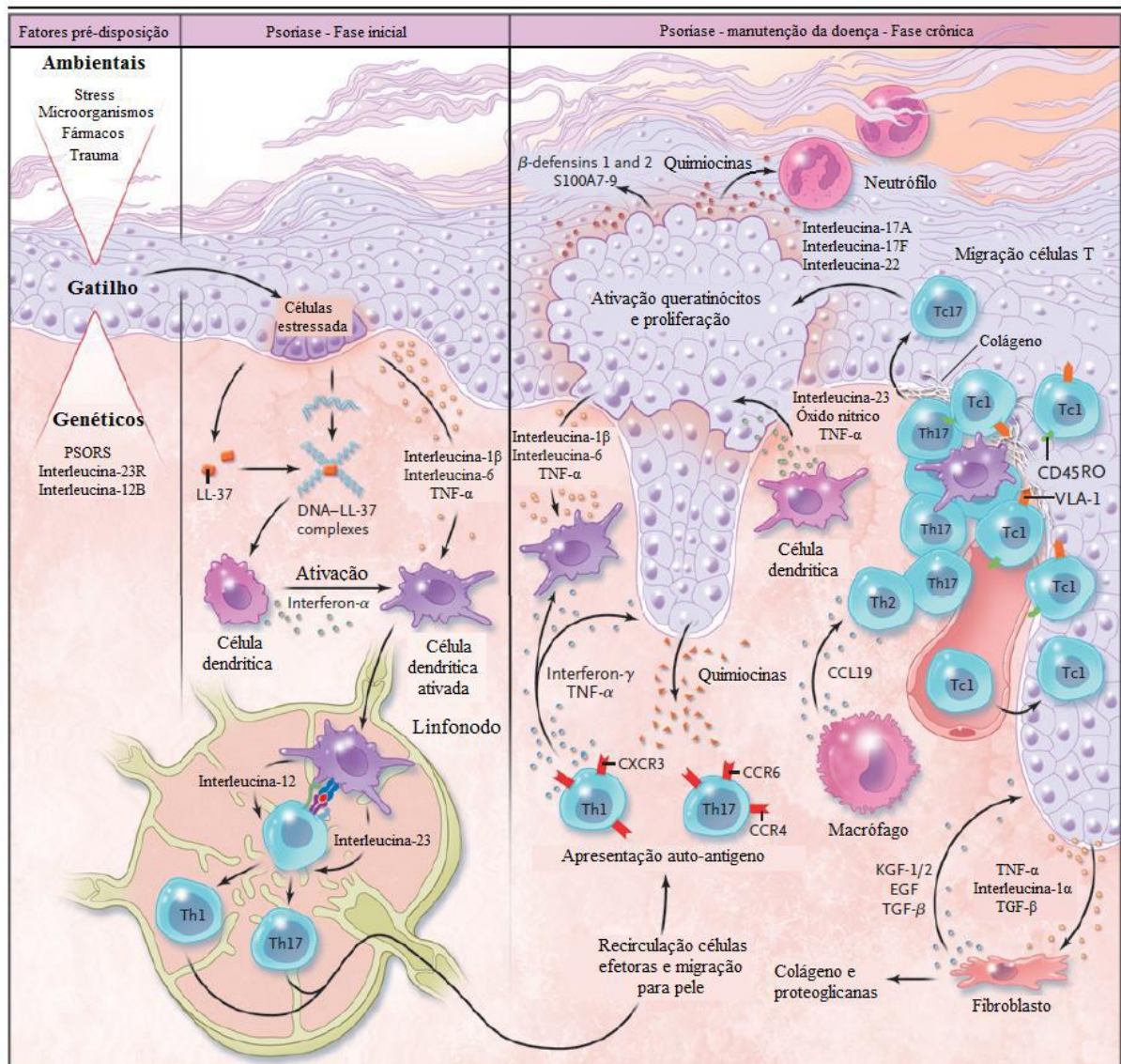
A imunopatogênese da psoríase envolve alterações no sistema imunológico inato (queratinócitos, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células endoteliais) e no sistema imunológico adquirido (linfócitos T), mediada por citocinas. Após a ativação imunocítica, há várias etapas pelas quais a pele pré-psoriática é convertida em uma placa psoriática. A formação das lesões características da psoríase inclui:

- a) uma resposta do tecido angiogênico;
- b) recrutamento e acúmulo de células inflamatórias na derme, envolvendo grande população de células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas e macrófagos, e células T;
- c) liberação de citocinas pró-inflamatórias, que mantêm o ciclo vicioso de inflamação no interior das lesões cutâneas.

Esses eventos culminam na remodelação da epiderme, com proliferação e diferenciação alterada dos queratinócitos (RENDON; SCHÄKE, 2019).

A fase inicial da psoríase envolve um gatilho, que é resultante de uma ação recíproca entre fatores ambientais e genéticos, que desencadeiam uma cascata inflamatória e imunológica (Figura 6). Os queratinócitos ativam as células dendríticas dérmicas, que por sua vez ativam as células T nos nódulos linfáticos. Em seguida, as células T se diferenciam em células T *helper* Tipo 1 (Th1), produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2; e T *helper* Tipo 17 (Th17), produtoras de IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-22. Essas células já diferenciadas migram de volta para a derme e epiderme, através de quimiocinas e moléculas de adesão. Posteriormente, as células T ativam os macrófagos a liberarem diversas citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-12 e IL-23, que facilitam a proliferação de Th1/Th17 e também levam a hiperproliferação e ativação de queratinócitos, desenvolvendo clinicamente as placas psoriáticas (ARMSTRONG; READ, 2020; BRANDON; MUFTI; SIBBALD, 2019; RENDON; SCHÄKE, 2019; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015).

Figura 6 - Esquema evolutivo do quadro inflamatório característico da psoríase



Fonte: adaptado de Nestle, Kaplan e Barker, 2009.

Tanto na fase inicial, quanto na fase de exacerbação do quadro inflamatório da psoríase, as células dendríticas ativadas produzem o TNF- $\alpha$  e outros mediadores. O fator de necrose tumoral alfa, TNF- $\alpha$ , é uma citocina pró-inflamatória capaz de ampliar a inflamação através de várias vias de sinalização, e é produzida por uma grande variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos, queratinócitos e células endoteliais. Sua atividade está relacionada à indução da produção de mediadores secundários e moléculas de adesão que facilitam a interação e migração de células T em direção à epiderme. Embora as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , não sejam a causa inicial da psoríase, são susceptíveis a desempenhar um papel-chave na doença, mantendo a inflamação da pele. Por estarem com sua expressão

aumentada, essas citocinas são alvo molecular para o tratamento. A redução ou a inibição de uma ou várias citocinas pró-inflamatórias pode ser considerada uma estratégia atrativa para o tratamento da psoríase (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009).

O tratamento da psoríase é realizado com base na gravidade da doença. Aproximadamente 70-80% dos pacientes utilizam a terapia tópica com análogos da vitamina D3 (calcipotriol, calcitriol e tacalcitol) e retinóicos em associação aos corticoesteroides. Nos casos de psoríase moderada a severa, recomenda-se a terapia sistêmica com agentes imunossupressores e quimioterápicos (ciclosporina, metotrexato e retinóides), associada à terapia tópica e fototerapia, que também pode ser realizada sozinha (sem outros agentes ou medicamentos) no caso de placas psoriáticas estáveis, sendo um tratamento eficaz, seguro e acessível (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015; ZHANG; WU, 2018). Embora a maioria dos tratamentos estabelecidos seja razoavelmente eficaz como terapia de curto prazo, devido ao perfil de segurança desses fármacos, seu uso por um longo período é limitado, o que dificulta o controle da doença (ARMSTRONG; READ, 2020).

Os avanços nos estudos envolvendo a psoríase forneceram subsídios para a concepção de novos agentes biológicos modificadores da resposta imunoinflamatória através da sua ação nos mecanismos-chave da patogênese da doença. Dentre eles, destacam-se os anticorpos monoclonais (adalimumabe, infliximabe) e proteína de fusão (etanercepte), antagonistas de TNF- $\alpha$ . No entanto, esses agentes apresentam algumas desvantagens, como a via de administração, propriedades imunossupressoras e elevado custo, sendo utilizados, em sua maioria, em casos graves e quando os demais tratamentos não são adequados (BRANDON; MUFTI; SIBBALD, 2019; RENDON; SCHÄKE, 2019).

Os tratamentos utilizados na psoríase são frequentemente associados à eficácia limitada e a problemas relacionados à toxicidade e imunossupressão. Por isso, estudos estão sendo conduzidos no desenvolvimento de novas estratégias, buscando uma melhora na relação risco-benefício dos corticoides e dos fármacos tradicionalmente empregados no tratamento dessa doença. Além disso, existem pesquisas no campo de desenvolvimento de nanopartículas para aplicações dermatológicas, com o propósito de proporcionar uma liberação sustentada dos fármacos por um período prolongado de tempo, reduzir a toxicidade e aumentar a adesão do paciente ao tratamento (RAUT; PRABHU; PATRAVALE, 2013; PRADHAN;



SINGH; SINGH, 2015). A normalização dos níveis das citocinas inflamatórias por meio da inibição dessas citocinas, como o TNF- $\alpha$ , melhora o fenótipo da doença. Dentre as propostas terapêuticas que envolvem a inibição de citocinas na psoríase, destaca-se a terapia gênica por meio da administração de siRNAs, que ocasiona silenciamento da produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e, assim, diminui o quadro inflamatório (DESAI *et al.*, 2013; DESMET *et al.*, 2018; VIEGAS *et al.*, 2020).

### **1.6. Via de administração tópica para siRNAs**

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a cerca de 15% do peso corporal. Entre as suas múltiplas funções, um de seus principais papéis é o de evitar a invasão de agentes externos, sendo uma barreira defensiva às ameaças do ambiente exterior. Por outro lado, também pode ser utilizada como porta de entrada para substâncias terapêuticas, como fármacos e vacinas, se os mecanismos que conferem as propriedades de barreira forem entendidos e explorados. Por isso, a pele acaba se tornando uma atrativa e importante via para a liberação de fármacos, permitindo uma aplicação terapêutica não invasiva em uma ampla região corpórea. Além de ser uma via de administração com direcionamento para as doenças cutâneas (administração tópica), também pode ser utilizada para obtenção de efeitos sistêmicos (administração transdérmica). Esta via combina fatores como comodidade do paciente, ausência de metabolismo hepático e eliminação de possíveis efeitos colaterais da administração sistêmica (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004; BARBIERI *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2018; BORGHETI-CARDOSO *et al.*, 2020).

Por receber um terço da circulação sanguínea, a pele representa uma rota ideal para tratamentos. A difusão do composto de interesse através da pele pode ocorrer por três caminhos distintos: através dos folículos pilosos associados às glândulas sebáceas, através dos ductos das glândulas sudoríparas e através do estrato córneo (KOU *et al.*, 1993; MOSER *et al.*, 2001). Porém, existem algumas barreiras e fatores a serem vencidos para que essa via seja viável, como o estrato córneo, camada mais externa da pele, o qual influencia a taxa de absorção e penetração de substâncias; a área de contato (local e extensão); duração da exposição; e integridade do estrato córneo e espessura da epiderme. Há ainda fatores relacionados à molécula a ser administrada, como lipofilicidade/hidrofiliicidade, peso molecular, concentração e o tipo de formulação que veicula a molécula (SMEDEN *et al.*, 2014; ZEB *et al.*, 2019).



Estudos envolvendo a aplicação de siRNAs para o tratamento de doenças cutâneas têm obtido avanços importantes na elucidação de potenciais alvos moleculares e no desenvolvimento de sistemas de liberação para entrega direcionada a células-alvo dessas moléculas. Doenças cutâneas relacionadas ao comportamento anormal das células (carcinoma espinocelular e melanoma), reações inflamatórias (vitiligo, psoríase e dermatite atópica), danos da pele (queimadura e ferida) e doenças de pele monogênicas (paquioníquia congênita) são alvo de interesse para as terapias com siRNAs, pois essas doenças apresentam alvos moleculares bem definidos que podem ser silenciados, resultando em benefícios terapêuticos (TRAN *et al.*, 2008; KIGASAWA *et al.*, 2010; VICENTINI *et al.*, 2013a, 2013b; BORGHETI-CARDOSO *et al.*, 2017; TOFANI *et al.*, 2018; VIEGAS *et al.*, 2020).

Para o estabelecimento de uma terapia eficaz via administração tópica utilizando siRNA, primeiramente é necessário que ocorra liberação eficiente do siRNA nas células-alvo. No entanto, existe um grande obstáculo para a viabilização dessa terapêutica, uma vez que a pele representa uma forte barreira, atribuída ao estrato córneo, que dificulta a penetração de substâncias administradas topicamente. Além disso, os siRNAs são macromoléculas hidrofílicas, as quais não conseguem atravessar a pele por difusão passiva (GEUSENS *et al.*, 2011; ZAKREWSKY; KUMAR; MITRAGOTRI, 2015; DESMET *et al.*, 2016).

Dentre as principais estratégias para a liberação de siRNAs na pele estão o uso de formulações (nanopartículas lipídicas, lipossomas, nanopartículas poliméricas, peptídeos, líquido iônico, entre outras), métodos químicos (promotores de absorção cutânea) e métodos físicos (iontoforese, sonoforese, microagulhas, eletroporação, dentre outros). Todas possuem a finalidade de reduzir as propriedades de barreira da pele, promover a penetração cutânea e a utilização dessa macromolécula no tratamento de doenças de pele (PAUDEL *et al.*, 2010; GEUSENS *et al.*, 2011; VICENTINI *et al.*, 2013a; ZAKREWSKY; KUMAR; MITRAGOTRI, 2015; DHARAMDASANI *et al.*, 2020; VIEGAS *et al.*, 2020)

Apesar de a pele possuir grande área de superfície, é possível obter um tratamento bem controlado de uma área limitada da pele por meio da modificação genética, de modo que essa região possa ser monitorizada e submetida a biópsia para melhoria funcional e/ou removida cirurgicamente, se os efeitos secundários indesejados ocorrerem. O sucesso no desenvolvimento da terapia gênica tem um potencial significativo para o tratamento de doenças de pele causadas por expressão

gênica, incluindo doenças alérgicas de pele, alopecia, câncer de pele, psoríase, hiperpigmentação e paquioníquia congênita (CHONG *et al.*, 2013; VICENTINI *et al.*, 2013a; TOFANI *et al.*, 2018; VIEGAS *et al.*, 2020).

Neste contexto, esta pesquisa propôs um sistema nanoestruturado híbrido de liberação de siRNA na pele associado com a internalização fotoquímica, como proposta de otimização da liberação endossomal do siRNA, para a terapia tópica da psoríase.

***CONCLUSÕES***

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que:

- a) foi possível desenvolver e validar um método analítico para detecção e quantificação do FS utilizado para a internalização fotoquímica, TPPS2a;
- b) a utilização do sistema QbD na otimização e obtenção da formulação das NPLs foi uma ferramenta interessante e importante para a avaliação da influência dos fatores do processo de produção das nanopartículas e nas suas propriedades físico-químicas. O uso dessa ferramenta permitiu a definição de uma composição adequada para as nanopartículas, a saber Compritol® 888 ATO (2,0%), Poloxamer 188 (1,5%) e PAH (0,10%), bem como o método de obtenção por homogeneização a quente, seguido da aplicação de Ultra-Turrax/sonicação de forma a obter um nanocarreador com características físico-químicas adequadas, estabilidade e capacidade para veicular TPPS2a e siRNA nas camadas da pele;
- c) especificamente observou-se que:
  - foi possível encapsular 99% do FS escolhido nesta pesquisa, o TPPS2a, no interior das NPLs, as quais foram capazes de complexar com eficiência o siRNA em uma concentração final de 10 µM, e liberá-lo de forma intacta, cumprindo importantes etapas para o sucesso da terapia com RNAi;
  - pelos ensaios de DSC, foi possível verificar que não houve formação de novas ligações químicas entre os componentes, apenas interação entre si, caracterizando as NPLs como híbridas de matriz monolítica;
  - a avaliação *in vitro* das formulações NPL e NPL-TPPS2a em queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (BALB/3T3) possibilitou a obtenção dos parâmetros de tratamento relacionados ao tempo de tratamento, concentração de partículas no meio (diluição da formulação), concentração de TPPS2a e subdose energética (intensidade de luz) para serem aplicados nas células sem alterar sua viabilidade. Foi evidenciado que a citotoxicidade celular está relacionada à proporção de volume de NPL administrada às células e, por consequência, à concentração do polímero catiônico PAH. Além disso, a formulação NPL foi capaz de promover uma elevada captação das

moléculas de siRNA-Alexa657 nas linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos observadas por citometria de fluxo e microscopia confocal, internalizando com eficiência o siRNA no citoplasma celular nas condições testadas;

- no ensaio de retenção cutânea *in vitro* com modelo de pele suína, as NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 levaram a um maior acúmulo do siRNA e TPPS2a nas camadas da pele (estrato córneo e epiderme viável), o que é desejável em sistemas que têm como foco de ação as células da epiderme para um silenciamento eficaz;
- a aplicação tópica da formulação NPL-TPPS2a-siRNA TNF $\alpha$  com uma dose energética de 75 J/cm<sup>2</sup> em modelo *in vivo* de psoríase induzida por IMQ em camundongos *Hairless* foi o protocolo de tratamento que demonstrou maior eficácia no silenciamento da citocina TNF $\alpha$  quando comparado com os demais tratamentos;
- os resultados de silenciamento da citocina TNF $\alpha$  foram acompanhados pela melhora fenotípica dos animais tratados com NPL-TPPS2a-siRNA TNF $\alpha$  e dose energética de 75 J/cm<sup>2</sup>, com redução do rubor e descamação, e as análises histológicas demonstraram uma redução da acantose e paraceratose, resultantes da redução do processo inflamatório.

Dessa forma, pode-se concluir que as nanopartículas híbridas polímero-lipídicas de matriz monolítica desenvolvidas e caracterizadas nesta pesquisa demonstraram ser um promissor sistema nanocarreador tópico para a liberação funcional de siRNA TNF $\alpha$  no tratamento da psoríase, pois foram capazes de complexar devidamente com o siRNA, superar as barreiras da administração tópica, promover uma elevada captação celular das moléculas de siRNA no citoplasma e silenciar seu alvo específico, silenciamento este que foi otimizado ao combinar esta terapia com a internalização fotoquímica.

Esses resultados abrem possibilidades para o desenvolvimento de uma plataforma de nanocarreadores associada à internalização fotoquímica, para administração cutânea de siRNAs com diferentes alvos, bem como a possibilidade de coencapsulação de outros tipos de moléculas terapêuticas visando a terapia de outras doenças cutâneas.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAD, A.; AQIL, M.; KOHLI, K.; SULTANA, Y.; MUJEEB, M. Enhanced transdermal delivery of an anti-hypertensive agent via nanoethosomes: statistical optimization, characterization and pharmacokinetic assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, p. 26-38, 2013.

AHAD, A.; AQIL, M.; KOHLI, K.; SULTANA, Y.; MUJEEB, M. Design, formulation and optimization of valsartan transdermal gel containing iso-eucalyptol as novel permeation enhancer: preclinical assessment of pharmacokinetics in Wistar albino rats. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, p. 1149-1162, 2014.

AHMED, S. A.; GOGAL JR., R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.

ALABI, C. A.; SAHAY, G.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Development of siRNA probes for studying intracellular trafficking of siRNA nanoparticles. **Integrative Biology**, v. 5, n. 1, p. 224-30, 2013.

ALDAYEL, A. M.; O'MARY, H. L.; VALDES, S. A.; LI, X.; THAKKAR, S. G.; MUSTAFA, B. E.; CUI, Z. Lipid nanoparticles with minimum burst release of TNF- $\alpha$  siRNA show strong activity against rheumatoid arthritis unresponsive to methotrexate. **Journal of Controlled Release**, v. 283, p. 280-289, 2018.

ALHADDAD, A.; DURIEU, C.; DANTELLE, G.; CAM, E. L.; MALVY, C.; TREUSSART, F.; BERTRAND, J. Influence of the internalization pathway on the efficacy of siRNA delivery by cationic fluorescent nanodiamonds in the Ewing sarcoma cell model. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1-8, 2012.

ALIABADI, H. M.; LANDRY, B.; SUN, C.; TANG, T.; ULUDAĞ, H. Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: where do we stand? **Biomaterials**, v. 33, n. 8, p. 2546-2569, 2012.

ALLEN JR., L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. Tradução de Elenara Lemos Senna. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ALVAREZ, R.; ELBASHIR, S.; BORLAND, T.; TOUDJARSKA, I.; HADWIGER, P.; JOHN, M.; ROEHL, I.; MORSKAYA, S. S.; MARTINELLO, R.; KAHN, J.; RANST, M. V.; TRIPP, R. A.; DEVINCENZO, J. P.; PANDEY, R.; MAIER, M.; NECHEV, L.; MANOHARAN, M.; KOTELIANSKI, V.; MEYERS, R. RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3952-62, 2009.

ARMSTRONG, W.; READ, C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review. **JAMA**, v. 323, n. 19, p. 1945-1960, 2020.

ASHRAFI, P.; SUN, Y.; DAVEY, N.; WILKINSON, S. C.; MOSS, G. P. The influence of diffusion cell type and experimental temperature on machine learning models of skin permeability. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, p. 197-208, 2020.

BAGLO, Y., HAGEN, L.; HØGSET, A.; DRABLØS, F.; OTTERLEI, M.; GEDERAAS, O. A. Enhanced efficacy of bleomycin in bladder cancer cells by photochemical internalization. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

BARBIERI, J. S.; WANAT, K.; SEYKORA, J. Skin: basic structure and function. **Pathobiology of Human Disease**, p. 1134-1144, 2014.

BASALIOUS, E. B.; EL-SEBAIE, W.; EL-GAZAYERLY, O. Application of pharmaceutical QbD for enhancement of the solubility and dissolution of a class II BCS drug using polymeric surfactants and crystallization inhibitors: development of controlled-release tablets. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p. 799-810, 2011.

BAYONA, A. M. P.; WOODHAMS, J. H.; PYE, H.; HAMOUDI, R. A.; MOORE, C. M.; MACROBERT, A. J. Efficacy of photochemical internalization using disulfonated chlorin and porphyrin photosensitisers: an *in vitro* study in 2D and 3D prostate cancer models. **Cancer Letters**, v. 393, p. 68-75, 2017.

BERG, K.; NORDSTRAND, S.; SELBO, P. K.; TRAN, D. T. T.; ANGELL-PETERSEN, E.; HØGSET, A. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. **Photochemical & Photobiological Science**, v. 10, p. 1637-1651, 2011.

BERG, K.; WEYERGANG, A.; PRASMICKAITE, L.; BONSTED, A.; HØGSET, A.; STRAND, M. T.; WAGNER, E.; SELBO, P. K. Photochemical internalization: a new tool for drug delivery. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 8, p. 362-372, 2007.

BERG, K.; SELBO, P. K.; PRASMICKAITE, L.; TJELLE, T. E.; SANDVIG, K.; MOAN, J.; GAUDERNACK, G.; FODSTAD, O.; KJØLSRUD, S.; ANHOLT, H.; RODAL, G. H.; RODAL, S. K.; HØGSET, A. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. **Cancer Research**, v. 59, n. 6, p. 1180-1183, 1999.

BERG, K.; MOAN, J. Lysosomes as photochemical targets. **International Journal of Cancer**, v. 59, p. 814-822, 1994.

BERG, K.; DIETZE, A.; KAALHUS, O.; HØGSET, A. Site-specific drug delivery by photochemical internalization enhances the antitumor effect of bleomycin. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 8476-8485, 2005.

BERSTAD, M. B.; CHEUNG, L. H.; BERG, K.; PENG, Q.; FREMSTEDAL, A. S. V.; PATZKE, S.; ROSENBLUM, M. G.; WEYERGANG, A. Design of an EGFR-targeting toxin for photochemical delivery: *in vitro* and *in vivo* selectivity and efficacy. **Oncogene**, v. 34, p. 5582-5592, 2015.



BEYERLE, A.; BRAUN, A.; MERKEL, O.; KOCH, F.; KISSEL, T.; STOEGER, T. Comparative *in vivo* study of poly(ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 1, p. 51-56, 2011.

BOAKYE, C. H. A.; PATEL, K.; DODDAPANENI, R.; BAGDE, A.; MAREPALLY, S.; SINGH, M. 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.

BOEHNCKE, W.-H.; SCHÖN, M. P. Psoriasis. **The Lancet**, v. 386, n. 9997, p. 983-994, 2015.

BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DEPIERI, L. V.; DINIZ, H.; CALZZANI, R. A. J.; FANTINI, M. C. A.; IYOMASA, M. M.; VICENTINI, F. T. M. C.; BENTLEY, M. V. L. B. Self-assembling gelling formulation based on a crystalline-phase liquid as a non-viral vector for siRNA delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 1, p. 72-82, 2014.

BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DEPIERI, L. V.; KOOIJMANS, S. A. A.; DINIZ, H.; CALZZANI, R. A. J.; VICENTINI, F. T. M. C.; MEEL, R. V. D.; FANTINI, M. A. C.; LYOMASA, M. M.; SCHIFFELERS, R. M.; BENTLEY, M. V. L. B. An *in situ* gelling liquid crystalline system based on monoglycerides and polyethylenimine for local delivery of siRNAs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 103-117, 2015.

BORGHETI-CARDOSO, L. N.; KOOIJMANS, S. A. A.; FENS, M. H. A. M.; MEEL, R. V. D.; VICENTINI, F. T. M. C.; FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; SCHIFFELERS, R. M. *In situ* gelling liquid crystalline system as local siRNA delivery system. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1681-1690, 2017.

BORGHETI-CARDOSO, L. N.; VIEGAS, J. S. R.; SILVESTRINI, A. N. P.; CARON, A. L.; PRAÇA, F. G.; KRAVICZ, M.; BENTLEY, M. V. L. B. Nanotechnology approaches in the current therapy of skin cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 2020.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455-475, 1960.

BRACKE, S.; DESMET, E.; GUERRERO-ASPIZUA, S.; TJABRINGA, S. G.; SCHALKWIJK, J.; VAN GELE, M.; CARRETERO, M.; LAMBERT, J. Identifying targets for topical RNAi therapeutics in psoriasis: assessment of a new *in vitro* psoriasis model. **Archives of Dermatological Research**, v. 305, p. 501-512, 2013.

BRANDON, A.; MUFTI, A.; SIBBALD, R. G. Diagnosis and management of cutaneous psoriasis: a review. **Advances in Skin & Wound Care**, p. 58-69, 2019.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BRUNO, K. Using drug-exciptient interactions for siRNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 13, p. 1210-1226, 2011.

BUMCROT, D.; MANOHARAN, M.; KOTELIANSKY, V.; SAH, D. W. Y. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. **Nature Chemical Biology**, v. 2, p. 711-719, 2006.

CAVALLARO, G.; SARDO, C.; CRAPARO, E. F.; PORSIO, B.; GIAMMONA, G. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: production and applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, p. 313-333, 2017.

CARVALHO, S. M.; NORONHA, C. M.; FLORIANIA, C. L.; LINO, R. C.; ROCHA, G.; BELLETTINIB, I. G.; OGLIARIA, P. J.; BARRETO, P. L. M. Optimization of ocoferol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p.278-285, 2013.

CAPECCHI, M. R. Altering the genome homologous recombination. **Science**, v. 244, n. 1, p. 1288-1292, 1989.

CAVALCANTI, S. M. T.; NUNES, C.; COSTA LIMA, S. A.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; REIS, S. 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.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 277-299, 2010.

CHALBATANI, G. M.; DANA, H.; GHARAGOUZLOO, E.; GRIJALVO, S.; ERITJA, R.; LOGSDON, C. D.; MEMARI, F.; MIRI, S. R.; RAD, M. R.; MARMARI, V. Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 3111-3128, 2019.

CHAUDHARY, Z.; AHMED, N.; REHMAN, A.; KHAN, G. M. Lipid polymer hybrid carrier systems for cancer targeting: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 67, n. 2, p. 86-100, 2018.

CHEOW, W. S.; HADINOTO, K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 85, p. 214-220, 2011.

CHONG, R. H. E.; GONZALEZ-GONZALEZ, E.; LARA, M. F.; SPEAKER, T. J.; CONTAG, C. H.; KASPAR, R. L.; COULMAN, S. A.; HARGEST, R.; BIRCHALL, J. C. Gene silencing following siRNA delivery to skin via coated steel microneedles: *In vitro* and *in vivo* proof-of-concept. **Journal of Controlled Release**, v. 166, p. 211-219, 2013.

COIMBRA, S.; FIGUEIREDO, A.; CASTRO, E.; ROCHA-PEREIRA, P.; SANTOS-SILVA, A. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 4, p. 389-398, 2012.

COLA, D. F. Sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados para Ivermectina e Metopreno visando controle de parasitas. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1034-1043, 2016.

DAKA, A.; PEER, D. RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 1508-1521, 2012.

DAVID, S.; PITARD, B.; BENOÎT, J.; PASSIRANIA, C. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 100-114, 2010.

DENG, Y.; WANG, C. C.; CHOY, K. W.; DU, Q.; CHEN, J.; WANG, Q.; LI, L.; CHUNG, T. K. H.; TANG, T. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. **Gene**, v. 538, n. 2, p. 217-227, 2014.

DE PAULA, D.; BENTLEY, M. V. L. B.; MAHATO, R. I. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. **RNA**, New York, N.Y., v. 13, n. 4, p. 431-456, 2007a.

DE PAULA, D.; BENTLEY, M. V. L. B.; MAHATO, R. I. Effect of iNOS and NF- $\kappa$ B gene silencing on b-cell survival and function. **Journal of Drug Targeting**, v. 15, p. 358-369, 2007b.

DESAI, P. R.; MAREPALLY, S.; PATEL, A. R.; VOSHAVAR, C.; CHAUDHURI, A.; SINGH, M. Topical delivery of anti-TNF  $\alpha$  siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation *in vivo*. **Journal of Controlled Release**, v. 170, p. 51-63, 2013.

DESMET, E.; BRACKE, S.; FORIER, K.; TAEVERNIER, L.; STUART, M. C. A.; DE SPIEGELEER, B.; RAEMDONCK, K.; VAN GELE, M.; LAMBERT, J. An elastic liposomal formulation for RNAi-based topical treatment of skin disorders: proof-of-concept in the treatment of psoriasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 500, n. 1-2, p. 268-274, 2016.

DESMET, E.; GELE, M. V.; GRINE, L.; REMAUT, K.; LAMBERT, J. Towards the development of a RNAi-based topical treatment for psoriasis: proof-of-concept in a 3D psoriasis skin model. **Experimental Dermatology**, v. 27, p. 463-469, 2018.

DHARAMDASANI, V.; MANDAL, A.; QI, Q. M.; SUZUKI, I. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; MITRAGOTRI, S. Topical delivery of siRNA into skin using ionic liquids. **Journal of Controlled Release**, v. 323, p. 475-482, 2020.

DONG, K.; GOYARTS, E. C.; PELLE, E.; TRIVERO, J.; PERNODET, N. Blue light disrupts the circadian rhythm and create damage in skin cells. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 41, p. 558-562, 2019.

DONG, Y.; SIEGWART, D. J.; ANDERSON, D. G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 144, p.133-147, 2019.

ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes & Development**, v. 15, p. 188-200, 2001.

FERREIRA, L. A. B.; RADAIC, A.; PUGLIESE, G. O.; VALENTINI, M. B.; OLIVEIRA, M. R.; DE JESUS, M. B. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 2, p. 149-166, 2014.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FOLDVARI, M.; CHEN, D. W.; NAFISSI, N.; CALDERON, D.; NARSINENI, L.; RAFIEE, A. Non-viral gene therapy: gains and challenges of non-invasive administration methods. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 165-190, 2015.

GAO, K.; HUANG, L. Achieving efficient RNAi therapy: progress and challenges. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 4, p. 213-225, 2013.

GARAIOVA, Z.; STRAND, S. P.; REITAN, N. K.; LÉLU, S.; STØRSET, S. Ø.; BERG, K.; MALMO, J.; FOLASIRE, O.; BJØRKØY, A.; DAVIESA, C. L. Cellular uptake of DNA-chitosan nanoparticles: the role of clathrin- and caveolae-mediated pathways. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1043-1051, 2012.

GELEY, S.; MÜLLER, C. RNAi: ancient mechanism with a promising future. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 7, p. 985-998, 2004.

GEUSENS, B.; STROBBE, T.; BRACKE, S.; DYNOODT, P.; SANDERS, N.; GELE, M. Van; LAMBERT, J. Lipid-mediated gene delivery to the skin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 199-211, 2011.

GOMES, M. J.; MARTINS, S.; FERREIRA, D.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and *in vitro* release and penetration studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1231-1242, 2014.

GUINDALINI, C.; DE OLIVEIRA, M. M. Quality by design: a new approach to accelerate the technological development in health. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 5, n. 1, p. 3-10, 2017.

GÜNTHER, M.; LIPKA, J.; MALEK, A.; GUTSCH, D.; KREYLING, W.; AIGNER, A. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting *in vivo* and siRNA delivery to the lung. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 438-449, 2011.

GUO, P.; COBAN, O.; SNEAD, N. M.; TREBLEY, J.; HOEPRICH, S.; GUO, S.; SHU, Y. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 650-666, 2010.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, p. 611-620, 1995.

GUZMAN-VILLANUEVA, D.; EL-SHERBINY, I. M.; VLASSOV, A. V.; HERRERA-RUIZ, D.; SMYTH, H. D.C. Enhanced cellular uptake and gene silencing activity of siRNA molecules mediated by chitosan-derivative nanocomplexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p. 579-590, 2014.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HADINOTO, K.; SUNDARESAN, A.; CHEOW, W. S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 427-443, 2013.

HAMDI, M.; ABDEL-BARI, H. M.; ELMOWAFY, E.; ALJAMAL, K. T.; AWAD, G. A. S. An integrated vitamin E-coated polymer hybrid nanoplatform: a lucrative option for an enhanced *in vitro* macrophage retention for an anti-hepatitis B therapeutic prospect. **PLOS ONE**, v. 15, p. 1-39, 2020.

HE, S.-N.; LI, Y.-L.; YAN, J.-J.; ZHANG, W.; DU, Y.-Z.; YU, H.-Y.; HU, F.-Q.; YUAN, H. Ternary nanoparticles composed of cationic solid lipid nanoparticles, protamine, and DNA for gene delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2859-2869, 2013.

HØGSET, A.; PRASMICKAITE, L.; SELBO, P. K.; HELLUM, M.; ENGESAETER, B. Ø.; BONSTED, A.; BERG, K. Photochemical internalisation in drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p.95-115, 2004.

HUANG, L.; LIU, Y. *In vivo* delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 13, p. 507-530, 2011.

IBRAHEEM, D.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Gene therapy and DNA delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 459, p. 70-83, 2014.

IQBAL, M. D.; TOUHID, B. S. Photochemical internalization: maximizing the potential of siRNA in cancer therapy through spatially and temporally controlled endolysosomal escape. **Journal of Cancer Research and Experimental Oncology**, v. 3, p. 26-32, 2011.

JACOBSON, G. B.; GONZALEZ-GONZALEZ, E.; SPITLER, R.; SHINDE, R.; LEAKE, D.; KASPAR, R. L.; CONTAG, C. H.; ZARE, R. N. Biodegradable nanoparticles with sustained release of functional siRNA in skin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 4261-4266, 2010.

JAKOBSEN, M.; STENDERUP, K.; ROSADA, C.; MOLDT, B.; KAMP, S.; DAM, T. N.; JENSEN, T. G.; MIKKELSEN, J. G. Amelioration of psoriasis by anti-TNF-alpha RNAi in the xenograft transplantation model. **Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 17, n. 10, p. 1743-1753, 2009.

JERJES, W.; THEODOSSIOU, T. A.; HIRSCHBERG, H.; HØGSET, A.; WEYERANG, A.; SELBO, P. K.; HAMDOON, Z.; HOPPER, C.; BERG, K. Photochemical internalization for intracellular drug delivery. From basic mechanisms to clinical research. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, p. 528-579, 2020.

JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D.; ENGLISH, J.; QUE, Q.; NAPOLI, C. A. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex TDNA sequences. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 957-973, 1996.

KAPOOR, M.; BURGESS, D. J.; PATIL, S. D. Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, n. 1, p. 35-57, 2012.

KARPANEN, T. J.; WORTHINGTON, T.; CONWAY, B. R.; HILTON, A. C.; ELLIOTT, T. S. J.; LAMBERT, P. A. Penetration of chlorhexidine into human skin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3633-3636, 2008.

KIGASAWA, K.; KAJIMOTO, K.; HAMA, S.; SAITO, A.; KANAMURA, K.; KOGURE, K. Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 157-160, 2010.

KLEINPENNING, M. M.; OTERO, M. E.; VAN ERP, P. E. J.; GERRITSEN, M. J. P.; VAN DE KERKHOFF, P. C. M. Efficacy of blue light vs. red light in the treatment of psoriasis: a double-blind, randomized comparative study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, p. 219-225, 2012.

KLEINPENNING, M. M.; SMITS, T.; FRUNT, M. H. A.; VAN ERP, P. E. J.; VAN DE KERKHOFF, P. C. M.; GERRITSEN, R. M. J. P. Clinical and histological effects of blue light on normal skin. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 26, p. 16-21, 2009.

KLOECKNER, J.; PRASMICKAITE, L.; HØGSET, A.; BERG, K.; WAGNER, E. Photochemically enhanced gene delivery of EGF receptor-targeted DNA polyplexes. **Journal of Drug Targeting**, p. 205-213, 2004.

KOU, J. H.; ROY, S. D.; DU, J.; FUJIKI, J. Effect of receiver fluid pH on *in vitro* skin flux of weakly ionizable drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 7, p. 986-990, 1993.

KREBS, M. D.; ALSBERG, E. Localized, targeted, and sustained siRNA delivery. **Chemistry**, v. 17, p. 3054-3062, 2011.

KRUEGER, J. G.; BOWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, p. ii30–ii36, 2005.

LI, J. M.; NEWBURGER, P. E.; GOUNIS, M. J.; DARGON, P.; ZHANG, X.; MESSINA, L. M. Local arterial nanoparticle delivery of siRNA for NOX2 knockdown to prevent

restenosis in an atherosclerotic rat model. **Gene Therapy**, v. 17, n. 10, p. 1279-1287, 2010.

LI, K.; ARMSTRONG, A. W. A review of health outcomes in patients with psoriasis. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n. 1, p. 61-72, 2012.

LI, Q.; CAI, T.; HUANG, Y.; XIA, X.; COLE, S. P. C.; CAI, Y. A review of the structure, preparation, and application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, v. 7, p. 122-147, 2017.

LILLETVEDT, M.; TØNNESEN, H. H.; HØGSET, A.; SANDE, S. A.; KRISTENSEN, S. Evaluation of physicochemical properties and aggregation of the photosensitizers TPCS2a and TPPS2a in aqueous media. **Pharmazie**, v. 66, n. 5, p. 325-33, 2011.

LIU, Z.; ZHENG, M.; MENG, F.; ZHONG, Z. Non-viral gene transfection *in vitro* using endosomal pH-sensitive reversibly hydrophobilized polyethylenimine. **Biomaterials**, v. 32, n. 34, p. 9109-9119, 2011.

LOPES, L. B.; FERREIRA, D. A.; DE PAULA, D.; GARCIA, M. T. J.; THOMAZINI, J. A.; FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M. V. L. B. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: *in vitro* and *in vivo* skin penetration of cyclosporin A. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, p. 1332-1342, 2006.

LU, J. J.; LANGER, R.; CHEN, J. A novel mechanism is involved in cationic lipid mediated functional siRNA delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 763-771, 2009.

MA, P.; LI, T.; XING, H.; WANGD, S.; SUNE, Y.; SHENGF, X.; WANG, K. Local anesthetic effects of bupivacaine loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p.689-695, 2017.

MALTESEN, M. J.; BJERREGAARD, S.; HOVGAARD, L.; HAVELUND, S.; WEERT, M. V. Quality by design spray drying of insulin intended for inhalation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 828-838, 2008.

MANDAL, B.; BHATTACHARJEE, H.; MITTAL, N.; SAH, H.; BALABATHULA, P.; THOMA, L. A.; WOOD, G. C. Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, p. 474-491, 2013.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p. 1-37, 2009.

MARTÍNEZ, T.; JIMÉNEZ, A. I.; PAÑEDA, C. Short-interference RNAs: becoming medicines. **EXCLI Journal**, v. 14, p. 714-746, 2015.

MELLERT, K.; LAMLA, M.; SCHEFFZEK, K.; WITTIG, R.; KAUFMANN, D. Enhancing endosomal escape of transduced proteins by photochemical internalisation. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1-9, 2012.

MONIRINASAB, H.; ASADI, H.; ROSTAMIZADEH, K.; ESMAEILZADEH, A.; KHODAEI, M.; FATHI, M. Novel lipid-polymer hybrid nanoparticles for siRNA delivery and IGF-1R gene silencing in breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 48, p. 96-105, 2018.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p.103-112, 2001.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p.161-177, 2000.

NABEL, G. J. Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future. **Nature Medicine**, v. 10, n. 2, p. 135-141, 2004.

NESTLE, F. O.; KAPLAN, D. H.; BARKER, J. Psoriasis. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 496-509, 2009.

NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. The RNAi revolution. **Nature**, v. 430, p. 161-164, 2004.

OLIVEIRA, S.; FRETZ, M. M.; HOGSET, A.; STORM, G.; SCHIFFELERS, R. M. Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1211-1217, 2007.

OLIVEIRA, S.; HOGSET, A.; STORM, G. Delivery of siRNA to the target cell cytoplasm: photochemical internalization facilitates endosomal escape and improves silencing efficiency, *in vitro* and *in vivo*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 34, p. 3686-97, 2008.

OZCAN, G.; OZPOLAT, B.; COLEMAN, R. L.; SOOD, A. K.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 87, p. 108-119, 2015.

PATIL, H.; FENG, X.; YE, X.; MAJUMDAR, S.; REPKA, M. A. Continuous production of fenofibrate solid lipid nanoparticles by hot-melt extrusion technology: a systematic study based on a quality by design approach. **The AAPS Journal**, v. 17, n. 1, p. 194-205, 2015.

PATWARDHAN, K.; ASGARZADEH, F.; DASSINGER, T.; ALBERS, J.; REPKA, M. A. A quality by design approach to understand formulation and process variability in pharmaceutical melt extrusion processes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, p. 673-684, 2014.



PAUDEL, K. S.; MILEWSKI, M.; SWADLEY, C. L.; BROGDEN, N. K.; GHOSH, P.; STINCHCOMB, A. L. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 1, n. 1, p. 109-31, 2010.

PECOT, C. V.; CALIN, G. A.; COLEMAN, R. L.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; SOOD, A. K. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 59-67, 2011.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; PRAÇA, F. S. G.; DEL CIAMPO, J. O.; FANTINI, M. A. C.; FONSECA, M. J. V.; BENTLEY, M. V. L. B. 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, p. 1063-1073, 2016.

PFUFF, S.; LIEBMANN, J.; BORN, M.; MERK, H. F.; VON FELBERT, V. Prospective randomized long-term study on the efficacy and safety of UV-free blue light for treating mild psoriasis vulgaris. **Dermatology**, v. 231, n. 1, p. 24-34, 2015.

PRAÇA, F. S. G.; MEDINA, W. S. G.; ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; CAMPOS, P. M.; ASCENSO, A.; BENTLEY, M. V. L. B. 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.

PRADHAN, M.; SINGH, D.; SINGH, M. R. Development characterization and skin permeating potential of lipid based novel delivery system for topical treatment of psoriasis. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 186, p. 9–16, 2015.

PRASAD, P.; SHUHENDLER, A.; CAI, P.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Doxorubicin and mitomycin C co-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles inhibit growth of sensitive and multidrug resistant human mammary tumor xenografts. **Cancer Letters** v.334, p.263-273, 2013.

PRASMICKAITE, L., HØGSET, A.; BERG, K. Evaluation of different photosensitizers for use in photochemical gene transfection. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 4, p. 388-395, 2001.

PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 115-124, 2004.

QI, R.; KIU, S.; CHEN, J.; XIAO, H.; YAN, L.; HUANG, Y.; JING, X. Biodegradable copolymers with identical cationic segments and their performance in siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 129, n. 2, p. 251-260, 2012.

RAEMDONCK, K.; NAEYE, B.; BUYENS, K.; VANDENBROUCKE, R. E.; HØGSET, A.; DEMEESTER, J.; DE SMEDT, S. C. Biodegradable dextran nanogels for RNA interference: focusing on endosomal escape and intracellular siRNA delivery. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 9, p. 1406-1415, 2009.

RAEMDONCK, K.; NAEYE, B.; HØGSET, A.; DEMEESTER, J.; DE SMEDT, S. D. Prolonged gene silencing by combining siRNA nanogels and photochemical internalization. **Journal of Controlled Release**, v. 145, p. 281-288, 2010.

RAMÍREZ-MOYA, J.; BAKER, L. A.; SLACK, F. J.; SANTISTEBAN, P. ADAR1-mediated RNA editing is a novel oncogenic process in thyroid cancer and regulates miR-200 activity. **Oncogene**, v. 39, p. 3738-3753, 2020.

RATHORE, A. S. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 546-553, 2009.

RAUT, A. S.; PRABHU, R. H.; PATRAVALE, V. B. Psoriasis clinical implications and treatment: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 30, n. 3, p. 183-216, 2013.

RAYCHAUDHURI, S. K.; MAVERAKIS, E.; RAYCHAUDHURI, S. P. Diagnosis and classification of psoriasis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 490-495, 2014.

REISCHL, D.; ZIMMER, A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 8-20, 2009.

RENDON, A.; SCHÄKEL, K. Psoriasis pathogenesis and treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1475-1503, 2019.

ROSA, J.; SUZUKI, I.; KRAVICZ, M.; CARON, A.; PUPO, A. V.; PRAÇA, F. G.; BENTLEY, M. V. L. B. Current non-viral siRNA delivery systems as a promising treatment of skin diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 2644-2663, 2018.

ROSSETTI, F. C.; DEPIERI, L. V.; PRAÇA, F. S. G.; DEL CIAMPO, J. O.; FANTINI, M. C. A.; PIERRE, M. B. R.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M. V. L. B. Optimization of protoporphyrin IX skin delivery for topical photodynamic therapy: nanodispersions of liquid-crystalline phase as nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 99-108, 2016.

SAADI, S.; ARIFFIN, A. A.; GHAZALI, A. M.; MISKANDAR, M. S.; BOO, H. C.; ABDULKARIM, S. M. Application of differential scanning calorimetry (DSC), HPLC and pNMR for interpretation primary crystallisation caused by combined low and high melting TAGs. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 603-612, 2012.

SAH, D. W. Y. Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders. **Life Sciences**, v. 79, n. 19, p. 1773-1780, 2006.

SARRA, M.; CARUSO, R.; CUPI, M. L.; MONTELEONE, I.; STOLFI, C.; CAMPIONE, E.; DILUVIO, L.; MAZZOTTA, A.; BOTTI, E.; CHIMENTI, S.; COSTANZO, A.; MACDONALD, T. T.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. IL-21 promotes skin recruitment of CD4(+) cells and drives IFN- $\gamma$ -dependent epidermal hyperplasia. **The Journal of Immunology**, v. 186, p. 5435-5442, 2011.

SAW, P. E., SONG, E. siRNA therapeutics: a clinical reality. **Science China Life Sciences**, v. 63, n. 4, p. 485-500, 2020.

SCHERER, L. J.; ROSSI, J. J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1457-1465, 2003.

SCHROEDER, U. Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 11, p.1305-1307, 1998.

SCHROEDER, A.; LEVINS, C. G.; CORTEZ, C.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 1, p. 9-21, 2010.

SELBO, P. K.; SIVAM, G.; FODSTAD, O.; SANDVIG, K.; BERG, K. *In vivo* documentation of photochemical internalization, a novel approach to site specific cancer therapy. **International Journal of Cancer**, v. 92, p. 761-766, 2001.

SELBO, P. K.; WEYERGANG, A.; BONSTED, A.; BOWN, S. G.; BERG, K. Photochemical internalization of therapeutic macromolecular agents: a novel strategy to kill multidrug-resistant cancer cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, p. 604-612, 2006.

SELBO, P. K.; WEYERGANG, A.; HØGSET, A.; NORUM, O.; BERSTAD, M. B.; VIKDAL, M.; BERG, K. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 1, p. 2-12, 2010.

SENGEL-TURK, C. T.; HASCICEK, C. Design of lipid-polymer hybrid nanoparticles for therapy of BPH: part I. Formulation optimization using a design of experiment approach. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 16-27, 2017.

SHI, J.; XU, Y.; XU, X.; ZHU, X.; PRIDGEN, E.; WU, J.; VOTRUBA, A. R.; SWAMI, A.; ZETTER, B. R.; FAROKHZAD, O. M. Hybrid lipid-polymer nanoparticles for sustained siRNA delivery and gene silencing. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, p. 897-900, 2014.

SHIRAIISHI, T.; NIELSEN, P. E. Photochemically enhanced cellular delivery of cell penetrating peptide-PNA conjugates. **FEBS Letters**, p. 1451-1456, 2006.

SHRIVASTAVA, V. K.; LONDHE, N. D.; SONAWANE, R. S.; SURI, J. S. First review on psoriasis severity risk stratification: an engineering perspective. **Computers in Biology and Medicine**, v. 63, p. 52-63, 2015.

SIFUENTES-ROMERO, I.; MILTON, S. L.; GARCÍA-GASCA, A. Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: where do we stand? **Mutation Research**, v. 728, n. 3, p. 158-171, 2011.

SMEDEN, J. V.; JANSSENS, M.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1841, p. 295-313, 2014.

SULTAN, A. A.; JERJES, W.; BERG, K.; HØGSET, A.; MOSSE, C. A.; HAMOUDI, R.; HAMDOON, Z.; SIMEON, C.; CARNELL, D.; FORSTER, M.; HOPPER, C. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a)-induced photochemical internalisation of bleomycin in patients with solid malignancies: a phase 1, dose-escalation, first-in-man trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, p. 1217-1229, 2016.

SUN, L.; LIU, Z.; LIN, Z.; CUN, D.; TONG, H. H. Y.; YAN, R.; WANG, R.; ZHENG, Y. Comparison of normal versus imiquimod-induced psoriatic skin in mice for penetration of drugs and nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 5625-5635, 2018.

TAHIR, N.; MADNI, A.; CORREIA, A.; REHMAN, M.; BALASUBRAMANIAN, V.; KHAN, M. M.; SANTOS, H. A. Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 4961-4974, 2019.

THO, I.; BAUER-BRANDL, A. Quality by Design (QbD) approaches for the compression step of tableting. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, p. 1631-1644, 2011.

TOFANI, L. B.; DEPIERI, L. V.; CAMPOS, P. M.; RIUL, T. B.; ANTONIETTO, K. S.; FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M. V. L. B. *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, p. 1-13, 2018.

TRAN, M. A.; GOWDA, R.; SHARMA, A.; PARK, E. J.; ADAIR, J.; KESTER, M.; SMITH, N. B.; ROBERTSON, G. P. Targeting V600E-B-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. **Cancer Research**, v. 68, n. 18, p. 7638-7649, 2008.

VAN DER FITS, L.; MOURITS, S.; VOERMAN, J. S. A.; KANT, M.; BOON, L.; LAMAN, J. D.; LUBBERTS, E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. **The Journal of Immunology**, v. 18, n. 9, p. 5836-45, 2009.

VAN DER KROL, A. R.; MUR, L. A.; BELD, M.; MOL, J. N.; STUITJE, A. R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **The Plant Cell**, v. 2, p. 291-299, 1990.

VERMA, I. M.; WEITZMAN, M. D. Gene therapy: twenty-first century medicine. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 711-738, 2005.

VICENTINI, F. T. M. C.; BORGHETTI-CARDOSO, L. N.; DEPIERI, L. V.; MANO, D. M.; ABELHA, T. F.; PETRILLI, R.; BENTLEY, M. V. L. B. Delivery systems and local administration routes for therapeutic siRNA. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 915-931, 2013a.

VICENTINI, F. T. M. C.; DEPIERI, L. V.; POLIZELLO, A. C. M.; DEL CIAMPO, J. O.; SPADARO, A. C. C.; FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid crystalline phase

nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 16-24, 2013b.

VIEGAS, J. S. R.; PRAÇA, F. G.; CARON, A. L.; SUZUKI, I.; SILVESTRINI, A. V. P.; MEDINA, W. S. G.; DEL CIAMPO, J. O.; KRAVICZ, M.; BENTLEY, M. V. L. B. Nanostructured lipid carrier co-delivering tacrolimus and TNF- $\alpha$  siRNA as an innovative approach to psoriasis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, p. 646-660, 2020.

XU, J.; GANESH, S.; AMIJ, M. Non-condensing polymeric nanoparticles for targeted gene and siRNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, p. 21-34, 2012.

WANG, L.; GRIFFEL, B.; XU, X. Synthesis of PLGA-lipid hybrid nanoparticles for siRNA delivery using the emulsion method PLGA-PEG-lipid nanoparticles for siRNA delivery. **RNA Nanostructures**, p. 231-240, 2017.

WEINSTABL, A.; HOFF-LESCH, S.; MERK, H. F.; VON FELBERT, V. Prospective randomized study on the efficacy of blue light in the treatment of psoriasis vulgaris. **Dermatology**, v. 223, p. 251-259, 2011.

WEYERANG, A.; SELBO, P. K.; BERSTAD, M. E. B.; BOSTAD, M.; BERG, K. Photochemical internalization of tumor-targeted protein toxins. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, p.721-733, 2011.

WEYERANG, A.; BERSTAD, M. E. B.; BULL-HANSEN, B.; OLSEN, C. E.; SELBO, P. K.; BERG, K. Photochemical activation of drugs for the treatment of therapy-resistant cancers. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, p. 1465-1475, 2015.

WIRTH, T.; PARKER, N.; YLA-HERTTUALA, S. History of gene therapy. **Gene**, v. 525, p. 162-169, 2013.

WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 129-138, 2009.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Development of Solid Lipid Nanoparticles Containing Ionically Complexed Chemotherapeutic Drugs and Chemosensitizers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, n.8, 2004.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R., RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. **Journal of Controlled Release** v.116, p.275-284, 2006.

WOODHAMS, J.; LOU, P.; SELBO, P. K.; MOSSE, A.; OUKRIF, D.; MACROBERT, A.; NOVELLI, M.; PENG, Q.; BERG, K.; BOWN, S. G. Intracellular re-localisation by photochemical internalisation enhances the cytotoxic effect of gelonin-quantitative studies in normal rat liver. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 347-53, 2010.

WU, X. Y. Strategies for optimizing polymer-lipid hybrid nanoparticle-mediated drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 5, p. 609-612, 2016.

YERLIKAYA, F.; OZGEN, A.; VURAL, I.; GUVEN, O.; KARAAGAOGLU, E.; KHAN, M. A.; CAPAN, Y. Development and evaluation of paclitaxel nanoparticles using a quality-by-design approach. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, p. 3748-3761, 2013.

YIN, H.; KANASTY, R. L.; ELTOUKHY, A. A.; VEGAS, A. J.; DORKIN, J. R.; ANDERSON, D. G. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 8, p. 541-555, 2014.

YOSHIDA, K.; AWAJI, K.; SHIMIZU, S.; IWASAKI, M.; OIDE, Y.; ITO, M.; DAIRAKU, T.; ONO, T.; KASHIWAGI, Y.; SATO, K. Preparation of microparticles capable of glucose-induced insulin release under physiological conditions. **Polymers**, v. 10, p. 1164-1178, 2018.

YU, L. X. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. **Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 781-791, 2008.

ZAKREWSKY, M.; KUMAR, S.; MITRAGOTRI, S. Nucleic acid delivery into skin for the treatment of skin disease: Proofs-of-concept, potential impact, and remaining challenges. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 445-456, 2015.

ZAMORA, M. R.; BUDEV, M.; ROLFE, M.; GOTTLIEB, J.; HUMAR, A.; DEVINCENZO, J.; VAISHNAW, A.; CEHELKY, J.; ALBERT, G.; NOCHUR, S.; GOLLOB, J. A.; GLANVILLE, A. R. RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 4, p. 531-538, 2011.

ZEB, A.; ARIF, S. T.; MALIK, M.; SHAH, F. A.; DIN, F. U.; QURESHI, O. S.; LEE, E.; LEE, G.; KIM, J. Potential of nanoparticulate carriers for improved drug delivery via skin. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 49, p. 485-517, 2019.

ZHANG, L.; CHAN, J. M.; GU, F. X.; RHEE, J. W.; WANG, A. Z.; RADOVIC-MORENO, A. F.; ALEXIS, F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Self-Assembled Lipid\_Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. **American Chemical Society**. v.2, n.8, 2008.

ZHANG, P.; AN, K.; DUAN, X.; XU, H.; LI, F.; XU, F. Recent advances in siRNA delivery for cancer therapy using smart nanocarriers. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 4, p. 900-911, 2018.

ZHANG, P.; WU, M. X. A clinical review of phototherapy for psoriasis. **Lasers in Medical Science**, v. 33, p. 173-180, 2018.

ZHANG, R. X.; AHMED, T.; LI, L. Y.; LI, J.; ABBASIA, A. Z.; YU, X. Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks. **Nanoscale**, v. 9, p. 1334-1355, 2017.

ZHANG, R. X.; WONG, H. L.; XUE, H. Y.; EOH, J. Y.; WU, X. Y. Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy – strategies and perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 489-503, 2016.

ZHANG, X. X.; MCINTOSH, T. J.; GRINSTAFF, M. W. Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 42-58, 2012.

ZHAO, X.; LI, F.; LI, Y.; WANG, H.; REN, H.; CHEN, J.; NIE, G.; HAO, J. Co-delivery of HIF1a siRNA and gemcitabine via biocompatible lipid polymer hybrid nanoparticles for effective treatment of pancreatic cancer. **Biomaterials**, v. 46, p. 13-25, 2017.

ZHOU, Y.; ZHANG, C.; LIANG, W. Development of RNAi technology for targeted therapy – a track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 270-281, 2014.

ZIDAN, A. S.; SAMMOUR, O. A.; HAMMAD, M. A.; MEGRAB, N. A.; HABIB, M. J.; KHAN, M. A. Quality by design: understanding the formulation variables of a cyclosporine A self-nanoemulsified drug delivery systems by Box-Behnken design and desirability function. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, n. 1-2, p. 55-63, 2007.