UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MARGARETE MORENO DE ARAÚJO

**Nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para veiculação de siRNA
na terapia antisense de doenças cutâneas**

Ribeirão Preto

2017

RESUMO

ARAÚJO, M. M. **Nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para veiculação de siRNA na terapia antisense de doenças cutâneas**. 2017. 139f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A terapia gênica por RNA de interferência (RNAi) trata-se de um processo de silenciamento pós-transcricional capaz de suprimir a expressão de um determinado gene. No entanto, para se tornar eficaz, a terapia gênica utilizando siRNA (*small interfering* RNA - siRNA) é dependente de uma eficiente liberação e expressão do ácido nucléico nas células-alvo dentro dos tecidos ou órgãos. A literatura atual mostra algumas propostas de sistemas de liberação tópica de siRNA, entretanto, o uso de nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para complexação e liberação de siRNA na pele para o tratamento tópico de doenças cutâneas, ainda é pouco explorado, o que configura a inovação deste trabalho. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma nanopartícula híbrida lipídica associada a um polímero catiônico (NLS-PEI) como sistema de liberação tópica para siRNA, visando a terapia gênica como nova abordagem no tratamento de patologias cutâneas. Primeiramente a composição e o método de produção das NLS-PEIs foram otimizados. Como polímero catiônico, utilizou-se a polietilenoimina (PEI). As NLS-PEIs otimizadas, compostas pelo lipídeo Compritol® 888 ATO (2,0%), Poloxamer 188 (1,5%) e PEI (0,15 e 0,25%), apresentaram-se esféricas com superfície lisa e um tamanho médio de 165 nm, potencial zeta médio de +20 mV, concentração de partículas de 10^{13} /mL e com alta estabilidade (90 dias a 4°C). Foi demonstrado, por DSC, que a PEI interage tanto com o tensoativo na superfície das nanopartículas como também com o lipídeo. A avaliação de comportamento e ação *in vitro* das NLS-PEIs foi estudada em queratinócitos e fibroblastos, evidenciando que o tratamento não diminuiu a viabilidade celular e houve alta captação verificada por citometria de fluxo (acima de 80% de células transfectadas) e por microscopia confocal. No estudo *in vitro* de penetração das NLS-PEI complexado com siRNA-FAM em pele de orelha de porco, foi demonstrado a penetração cutânea aumentada de siRNA-FAM a partir das NLS-PEIs. Ensaio *in vivo* em modelo de inflamação cutânea aguda e crônica mostrou a eficácia das NLS-PEIs contendo siTNF- α , reduzindo a espessura da epiderme em comparação ao grupo controle, reduzindo o rubor, a descamação e os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α e seu RNAm correspondente. A NLS-PEI também promoveu a penetração cutânea das moléculas de siRNA nas camadas mais profunda da pele, *in vivo*. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que as formulações desenvolvidas são sistemas de liberação promissores para administração tópica de siRNA para o tratamento de patologias cutâneas na terapia gênica.

Palavras chave: siRNA, pele, nanopartículas híbridas lipídico-poliméricas, terapia gênica, aplicação tópica.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano correspondendo à cerca de 15% do peso corporal. Entre as múltiplas funções complexas da pele, um de seus papéis principais é o de evitar a invasão de agentes externos, agindo como uma barreira defensiva às ameaças do ambiente exterior. A pele possui mecanismos de defesa que lhe conferem barreiras de proteção física, imunológica e metabólica, a fim de inibir ataques de microorganismos, produtos químicos, radiação ultravioleta (UV) e de partículas. Por outro lado, a pele pode ser utilizada como uma porta de entrada para substâncias terapêuticas, tais como fármacos e vacinas, se os mecanismos que conferem as propriedades de barreira forem entendidos e explorados (BARBIERI et al., 2014; PROW et al., 2011).

De acordo com a Figura 1, a pele humana é estruturada histologicamente em duas camadas: a epiderme e a derme. Logo abaixo da derme existem um tecido de sustentação formado por tecido adiposo chamado hipoderme ou tecido celular subcutâneo (RIBEIRO, 2010).

A epiderme é constituída por um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso, sendo a camada mais externa do tecido cutâneo. É um epitélio versátil, cujas células se multiplicam, diferenciam e renovam periodicamente composto por queratinócitos os quais são elementos dominantes quanto ao número, representando 95% do conjunto das células epidérmicas (LAI-CHONG & MCGRATH, 2013; PROKSCH et al., 2008).

A divisão das células na camada basal origina varias camadas distintas, que à medida que migram para a superfície progressivamente se diferenciam, sofrendo mudanças morfológicas e metabólicas (SMEDEN et al., 2014). Os queratinócitos da epiderme são organizados em camadas, as quais são nomeadas em função da posição ou propriedade estrutural (Figura 1), como:

- *Camada basal* composta por células proliferativas sobre a junção dermoepidérmica;
- *Camada espinhosa* com células que apresentam grande quantidade de filamentos de queratina organizados ao redor do núcleo inseridos na periferia celular associados aos desmossomos, as células mais profundas têm forma poliédrica e as superficiais mais achatadas;

- *Camada granulosa* local de geração de componentes estruturais (grânulos de querato-hialina) e é responsável pela formação da bicamada lipídica que posteriormente vai formar a barreira epidérmica;

- *Camada córnea* formada por células anucleadas achatadas em estágio avançado de degeneração que se dispõem em lamelas num sistema bicompartimental de corneócitos ricos em proteínas rodeados por uma matriz lipídica contínua, essa camada é a responsável pela função de barreira e de proteção (BARBIERI et al., 2014; SMEDEN et al., 2014; PROW et al., 2011).

Figura 1 - Estrutura esquemática da pele (Adaptado de Pasparakis, 2014).

Dessa forma, a queratinização da epiderme, processo de diferenciação celular que leva à formação das células córneas, compreende dois fenômenos: migração

vertical das células surgidas da divisão das células basais e diferenciação destas células, durante sua viagem ascensional para chegar à formação de células córneas. Essas células sofrem esfoliação, ocorrendo dessa forma um deslocamento permanente e repetido de células, que da camada basal atingem gradualmente a superfície epidérmica, para se desprenderem já mortas. Essa diferenciação ocorre em torno de duas semanas para jovens e em torno de 37 dias para pessoas com mais de 50 anos (SMEDEN et al., 2014).

Os lipídeos, presentes no estrato córneo, conferem permeabilidade à água 1000 vezes menor que a maioria das membranas biológicas (SMEDEN et al., 2014). Essa impermeabilidade é considerada um problema, pois se estima que apenas uma pequena porcentagem de material ativo penetra através da pele quando aplicado topicamente (CEVC & VIERL, 2010).

Uma quinta camada, a lúcida é encontrada entre as camadas córnea e granular na palma das mãos e na sola dos pés, conferindo maior espessamento da pele nestas regiões (BARBIERI et al., 2014; PROW et al., 2011).

Dentro da epiderme há varias populações de células, como os melanócitos, que se localizam na camada basal da epiderme, sintetizam o pigmento melanina e transferem para os queratinócitos vizinhos, o que dá cor para a pele e protege contra a radiação UV; células de Langerhans e dendríticas apresentadoras de antígenos, as quais possuem funções imunológicas, e células de Merkel responsáveis pela sensação tátil. A epiderme não possui vasos, os nutrientes e oxigênio chegam à epiderme por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2013; CEVC & VIERL, 2010).

A derme é formada por tecido conjuntivo denso constituído por células e por abundante matriz extracelular, que tem como funções nutrição e sustentação da epiderme. Este tecido de sustentação é atravessado por inúmeros vasos e nervos, onde estão implantados os anexos cutâneos: glândulas sudoríparas e sebáceas, pelos e unhas. Considerada como verdadeiro “reservatório” de água, é suscetível de armazenar, trocar e fornecer massas variadas de água em função das necessidades do organismo. A matriz extracelular é composta por fibras de colágeno e elastina que se banham na substância fundamental, material amorfo formado por água, sais minerais e macromoléculas que são representadas pelos glicosaminoglicanos e glicoproteínas de estrutura. A derme se divide em papilar, que nutre a epiderme por difusão e, em reticular, com vasos sanguíneos de maior calibre e fibras de colágeno e elastina mais

espessas, importantes para a flexibilidade e distensão da pele (ERDŐ et al., 2016; LAI-CHEONG & MCGRATH, 2013).

Abaixo da derme está a hipoderme, ou tecido celular subcutâneo, é composta por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas da qual se apoia e é responsável pelo amortecimento de choques físicos e reserva energética (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2013).

A aplicação de substâncias ativas na pele ou através dela, abrem diversas possibilidades de uso para produtos farmacêuticos e cosméticos. Além disso, por receber um terço da circulação sanguínea, a pele representa uma rota ideal para tratamento. Todavia, a pele exerce função barreira através do estrato córneo, que é a camada mais externa da pele, a qual influencia a taxa de absorção/penetração de substâncias, juntamente com outros fatores como área de contato (local e extensão), duração da exposição, integridade do estrato córneo e espessura da epiderme; ainda, há aqueles fatores relacionados à molécula como lipofilicidade/hidrofiliabilidade, peso molecular, concentração e finalmente, tipo da formulação que veicula a molécula (SMEDEN et al., 2014; DELOUISE, 2012; CEVC & VIERL, 2010).

Depois que uma molécula ativa atravessa o estrato córneo, não há outra barreira à difusão nas outras camadas da pele se a molécula não ficar retida ou metabolizada no caminho. A permeação de substâncias através da pele pode ocorrer por difusão da substância ativa através da epiderme intacta ou através dos apêndices da pele, como: folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Esses caminhos pelos quais as moléculas podem atravessar o estrato córneo são: intercelular, intracelular, e folicular, como pode ser observado na Figura 2 (ZAKREWSKY et al., 2015).

O caminho intercelular é o maior responsável pela permeação da maioria dos fármacos (ERDŐ et al., 2016), pois a substância ativa não tem que atravessar os queratinócitos, apenas difunde-se pelas lamelas lipídicas que rodeiam os corneócitos. Na rota intracelular, a substância ativa não apenas difunde-se entre os lipídios como também atravessa os corneócitos preenchidos de queratina e lamelas lipídicas compostas de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres (PROKSCH et al., 2008). A via folicular acontece através de folículos pilosos associados às glândulas sebáceas, os quais correspondem a 0,1% da área da pele e servem como vias de acesso rápido de curto prazo, assim como as glândulas sudoríparas, para a derme profunda (ZAKREWSKY et al., 2015; ERDŐ et al., 2016).

Figura 2 - Estrutura esquemática das vias de penetração cutânea (Adaptado de Zakrewsky et al., 2015).

Com relação aos perfis de hidrofiliidade e lipofiliidade, a pele é formada de várias camadas que alternam essas propriedades, começando pelo estrato córneo que tem característica lipofílica (13% de água), seguido da epiderme viável (70% de água) e derme com características hidrofílicas. Se uma substância alcançar a derme, será absorvido pela circulação sanguínea local, podendo atingir a circulação sistêmica (CEVC & VIERL, 2010).

Devido a pele possuir grande área de superfície constitui-se o órgão mais acessível do corpo, oferecendo abordagens quanto a modificação de genes. É possível obter-se um tratamento bem controlado de uma área limitada da pele por meio da modificação genética, onde esta região pode ser monitorizada e ter biopsia 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 causada por expressão gênica aberrante, incluindo doenças alérgicas de pele, alopecia, câncer de pele, psoríase, hiperpigmentação e paquioníquia congênita (SEGRE, 2006; CHONG *et al.*, 2013; VICENTINI *et al.*, 2013^a; BARBIERI *et al.*, 2014).

1.2 TERAPIA GÊNICA – INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi)

A terapia gênica é definida como a transferência de material genético para células, tecidos ou órgãos com o objetivo de curar uma determinada doença ou melhorar

o estado clínico do paciente; o conceito é simples e envolve a entrega de ácidos nucleicos para células-alvo na tentativa de alterar a produção de uma proteína específica, levando a modificações na sua expressão e como consequência resultar em um benefício terapêutico (AL-SAIKHAN, 2013; DAVID & PEEBLES, 2008; HE *et al.*, 2013; IBRAHEEM, ELAISSARI, FESSI, 2014).

Esta terapia tem o potencial de alterar profundamente a maneira de abordar e tratar doenças crônicas e adquiridas porque permite regular, reparar, substituir, adicionar, deletar ou silenciar uma sequência gênica que é identificada como benéfica ou prejudicial ao funcionamento adequado do organismo. Por isso é importante porque oferece nova opção de tratamento para doenças atualmente incuráveis. A função da administração do gene correto é a de compensar o gene defeituoso contido na célula para, assim, conseguir recuperar sua função normal, eliminando o foco da doença e não apenas seus sintomas (DAVID & PEEBLES, 2008; HE *et al.*, 2013).

O silenciamento de genes pode ser realizado em nível transcricional ou pós-transcricional. O silenciamento gênico transcricional é baseado na manipulação de sequências gênicas pela inserção de mutações em regiões específicas do gene, produzindo proteínas truncadas ou proteínas com domínios não funcionais. Já no silenciamento gênico pós-transcricional a repressão da expressão gênica é feita pela degradação do RNA mensageiro (RNAm) (CAPECCHI, 1989; SCHERER; ROSSI, 2003; SIFUENTES-ROMERO *et al.*, 2011).

O processo de silenciamento gênico pós-transcricional foi descrito pela primeira vez, no início da década de 90, pelos grupos de Richard Jorgensens e Joseph Mols enquanto tentavam intensificar a coloração púrpura de petúnias por meio da introdução de transgenes responsáveis pela pigmentação (NAPOLI *et al.*, 1990; VAN DER KROL *et al.*, 1990). Entretanto, os resultados obtidos foram flores totalmente brancas ou irregularmente coloridas em decorrência do silenciamento, tanto do transgene, quanto do gene endógeno responsável pela pigmentação. Esse fenômeno foi denominado “co-supressão”. Mais tarde, um efeito semelhante foi encontrado no fungo *Neurospora crassa* e denominado “supressão” (NAPOLI *et al.*, 1990; VAN DER KROL *et al.*, 1990; FRANÇA *et al.*, 2010; SIFUENTES-ROMERO *et al.*, 2011).

No mesmo período, Guo e Kempthues estudavam a função do gene *par-1* no nematódeo *Carnorhabditis 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 (GUO & KEMPHUES, 1995). Enquanto isso, Andrew Fire e Craig Mello (1998) obtiveram resultados semelhantes ao injetarem as fitas senses e

antisense separadamente no nematódeo. Porém, ao injetarem as fitas juntas, observaram que moléculas de fita dupla de RNA (*double strand* RNA – dsRNA) eram mais efetivas que cada fita individualmente na supressão da expressão de um determinado gene com sequência similar àquele dsRNA (FIRE *et al.*, 1998; GARY, PURI & WON, 2007). Este processo foi denominado interferência por RNA (RNAi) e levou Fire & Mello ao prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2006.

A RNAi ganhou grande atenção e tornou-se um procedimento bastante utilizado para estudar a função dos genes e identificar potenciais genes alvos causadores de doenças. Além de ser uma importante ferramenta de pesquisa, a RNAi é uma grande promessa na terapia gênica para o silenciamento de genes causadores de doenças, aplicando-se, particularmente, para as doenças em que a redução ou supressão do produto de um gene alvo específico possa trazer benefícios terapêuticos (GUO *et al.*, 2010b).

O mecanismo de interferência por RNA pode ser dividido em duas fases distintas: a fase de iniciação, na qual ocorre a produção das moléculas efetoras, as quais podem ser classificadas em relação a sua origem e função em ao menos três categorias: siRNA (*small interfering* RNA), miRNA (microRNA) e shRNA (*short hairpin* RNA); e a fase de execução, na qual ocorre a incorporação das moléculas efetoras em complexos proteicos e a promoção do silenciamento gênico (GELEY; MULLER 2004; DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007).

O siRNA é gerado no citoplasma pela clivagem de dsRNA pela enzima Dicer em pequenos nucleotídeos de aproximadamente 21-23 bases (Figura 3). 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, contendo uma região dupla fita e uma alça fita simples formando uma estrutura denominada *hairpin*. Estes pre-miRNA são transportados para o citoplasma onde são clivados pela Dicer gerando um miRNA com cerca de 22 nucleotídeos. Na fase de execução, o siRNA e o miRNA são incorporados em complexos proteicos denominados RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), do qual a proteína Argonauta 2 (Ago 2) participa. Essa proteína é responsável pela seleção da fita do siRNA ou miRNA que será incorporada ao complexo RISC e apresenta atividade de endonuclease dirigida contra a fita de RNAm alvo. Uma helicase presente neste complexo abre a dupla-fita do siRNA, a fita sense é eliminada e a fita antisense guia o complexo até o RNAm alvo, que é clivado pelo complexo, degradando-o (DE PAULA *et al.*, 2007; VICENTINI *et al.*, 2013b). O siRNA tem uma complementaridade perfeita com

o RNAm alvo, enquanto o miRNA tem normalmente uma sequência imperfeita, o que leva o silenciamento gênico sem a degradação do RNAm (DAVID et al., 2010; GELEY; MULLER, 2004; DE PAULA et al., 2007; HUANG & LIU, 2011).

Figura 3 - Mecanismo de interferência por RNA (Adaptado de Ozcan et al., 2015).

Em células de mamíferos, os siRNAs são tipicamente exógenos, muitas vezes introduzidos na célula por um vírus invasor. O silenciamento de gene pelo siRNA pode ser conseguido por meio de duas estratégias básicas: 1) os vetores virais ou plasmídeos entram no núcleo e são transcritos para produção de sequências curtas de RNA (*hairpin*) as quais são transportadas para o citoplasma e processadas em siRNAs pela enzima Dicer; 2) ou há a introdução de um siRNA sintético (21-23 nucleotídeos) no citoplasma que sofre um processamento direto por meio do complexo multimérico chamado RISC, este convenientemente ignora o mecanismo Dicer (GUO et al., 2011; JACKSON & LINSLEY, 2010; GUZMAN-VILLANUEVA et al., 2014).

O silenciamento gênico com a utilização de siRNA criou um novo paradigma no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos em relação à terapêutica tradicional com o uso de pequenas moléculas e anticorpos monoclonais. Para projetar uma terapêutica com o uso de siRNA requer-se apenas o conhecimento da sequência do gene alvo de interesse. Além disso, pelo fato do mecanismo de RNAi mediado por siRNA ocorrer no citoplasma, tem-se uma potencial vantagem em relação a outros mecanismos de regulação gênica que necessitam da entrada da molécula efetora no núcleo celular (GUO et al., 2010b). Ademais, o siRNA é específico e consegue bloquear a expressão somente da proteína de interesse, já como fármaco convencional, devido à similaridade estrutural entre algumas proteínas, o bloqueio não-específico pode acontecer. Outra vantagem sobre fármacos convencionais é que a inibição da expressão gênica pode ser mais efetiva para o alcance do resultado terapêutico do que o bloqueio da proteína alvo, isto porque uma molécula de RNAm é traduzida em várias cópias de proteína e um siRNA pode silenciar múltiplas cópias de RNAm (BUMCROT et al., 2006; DAKA & PEER, 2012).

Diversos estudos clínicos para terapias à base de siRNA estão sendo conduzidos e os resultados mostram-se promissores reforçando a grande viabilidade dessa nova modalidade (OZCAN et al., 2015).

1.2.1 Desafios para uso terapêutico do siRNA

siRNAs são moléculas de RNA dupla fita estruturalmente bem definida com alto peso molecular (~ 13kDa). Possuem geralmente 19-21 pares de bases, sendo a extremidade 5' fosforilada e a extremidade 3' hidroxilada e com 2 nucleotídeos desemparelhados em cada ponta (Figura 4). Para a realização do efeito desejado, é necessário que as moléculas de siRNA atravessem a membrana plasmática e alcancem seu alvo: o interior das células. A membrana plasmática das células é uma estrutura dinâmica com característica lipofílica e grupos de fosfolipídios aniônicos. Como resultado, ela restringe a entrada de moléculas grandes, hidrofílicas e eletricamente carregadas (grupos fosfatos aniônicos), exatamente como as moléculas de RNA, o que faz com que a passagem pela membrana se torne um processo difícil (ALIABADI *et al.*, 2012; KHALIL *et al.*, 2006; XU, GANESH, AMIJI, 2012; CHONG *et al.*, 2013).

Figura 4 - Estrutura da molécula do siRNA.

As moléculas de siRNA também podem estimular uma resposta do sistema imunológico inato. Várias características podem influenciar a natureza e o grau de imunoestimulação e estas incluem a sequência do siRNA, sua estrutura, modificações químicas e os materiais utilizados na construção dos sistemas de liberação (OZCAN et al., 2015).

Outro desafio da terapêutica com siRNA está relacionado a estabilidade dessas moléculas em fluidos biológicos (OZCAN et al., 2015). Quando veiculadas na forma livre, são quase instantaneamente degradadas pela ação de RNase A, que resulta em uma curta meia-vida, de cerca de 30 min. Dessa forma, as estratégias utilizadas para aumento de estabilidade do siRNA livre é modificação química com o intuito de reduzir a atividade da nuclease e/ou uso de um sistema de liberação que proteja e carregue essa molécula (ALIABADI et al., 2012; GUZMAN-VILLANUEVA et al., 2014).

Portanto, o sucesso da terapia gênica com siRNA é dependente de um eficiente carregamento e liberação, para que haja a expressão do agente terapêutico nas células-alvo dentro dos tecidos ou órgãos, sendo similar a outras estratégias terapêuticas que envolvem a administração de moléculas biológicas ativas. Com isso, é necessária a utilização de um sistema de liberação adequado para veiculação de tal agente terapêutico que o proteja da degradação *in vivo*, para limitar sua eliminação precoce e para liberar o siRNA nas células específicas para efetivo silenciamento.

1.2.2 Sistemas de liberação para veiculação do siRNA

As barreiras biológicas impostas à terapia a base de siRNA devem ser superadas com o auxílio de sistemas de liberação. Polímeros, lipídeos, proteínas ou peptídeos catiônicos constituem as principais classes de vetores do tipo não-virais para a

veiculação de siRNA e podem ser aplicados na liberação dos genes. Estes tipos de vetores mostram-se promissores devido sua segurança, possibilidade de direcionamento para diferentes alvos celulares por meio de modificações estruturais pela incorporação de ligantes, fácil síntese e baixa resposta imune do organismo quando comparados aos vetores virais (SCHATZLEIN & UCHEGBU, 2006). Os sistemas virais, embora tenham alta eficiência de transfecção, apresentam muitos riscos relacionados às reações imunes e tóxicas além de possível recombinação viral, assim, as questões de segurança são um obstáculo para seu uso (REISCHL; ZIMMER, 2009).

Um sistema carreador ideal para veiculação de siRNA deve ser capaz de (CHROEDER et al., 2010; PECOT et al., 2011; FOLVARI et al., 2015; HATTORI *et al.*, 2006):

- Ultrapassar as barreiras inerentes de cada via de administração;
- Ligar-se às moléculas de siRNA promovendo proteção contra a degradação enzimática;
- Facilitar a captação celular, uma vez que as moléculas de siRNA são incapazes de difundirem passivamente pelas membranas celulares devido a repulsão eletrostática ocasionada pela carga residual negativa do siRNA e da bicamada lipídica;
- Promover o escape endossomal liberando o conteúdo do endossomo no citoplasma celular antes que ocorra a metabolização do siRNA nos lisossomos;
- Ser inerte e não estimular uma resposta imunológica no organismo;
- Liberar as moléculas de siRNA intactas no citoplasma para um eficiente silenciamento gênico.

Os sistemas de liberação não-virais normalmente consistem de complexos formados entre polímeros ou lipídeos catiônicos e siRNA (REISCHL & ZIMMER, 2009). Os lipídeos 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 suficientemente estáveis para sustentar a complexação do ácido nucleico com o lipídeo ou polímero catiônico durante o seu transporte até a célula alvo protegendo-o da degradação e promovendo a sua internalização celular. A complexação siRNA/carreador catiônico evita os problemas de repulsão pela membrana celular que tem carga residual negativa e diminui o tamanho dos ácidos nucleicos devido à condensação da molécula (LIU et al., 2011; BEYERLE et al., 2011). Os siRNAs também podem ser conjugados com moléculas pequenas (ex. colesterol) e anticorpos. Soma-se a essas alternativas, a possibilidade de veiculação do siRNA em nanopartículas (lipossomas, nanopartículas

lipídicas, nanopartículas poliméricas, dentre outros), os quais apresentam resultados promissores na promoção da captação celular e silenciamento gênico em diferentes linhagens celulares e tecidos (REISCHL & ZIMMER, 2009; WANG et al., 2010; ZHOU et al., 2014; FOLDVARI et al., 2015).

Os ácidos nucleicos podem ser internalizados nas células por diversas vias de entrada e a preferencialmente utilizada dependerá das características do sistema carreador (tamanho, carga superficial, conformação e presença de ligantes) e da linhagem celular (SAHAY et al., 2010; VERCAUTEREN et al., 2012). A principal via de entrada do siRNA na célula é por endocitose (SCHROEDER et al., 2012) (Figura 5). Foi proposto que o escape endossomal de complexos internalizados por endocitose mediada por clatrina ocorre pela desestabilização da membrana endossomal pela presença dos lipídeos presentes nestes complexos. Caso esta desestabilização não ocorra, o conteúdo não será liberado no citoplasma e ocorrerá a sua degradação lisossomal. Na endocitose mediada por caveolina, o escape endossomal ocorre principalmente pela ruptura osmótica do endossomo num processo denominado “efeito esponja de prótons” (REJMAN et al., 2006). Assim, o complexo precisa ter características adequadas para que ocorra o escape endossomal (WAN et al., 2013).

O tamanho de partícula adequado depende do seu campo de aplicação, por exemplo, para obter uma acumulação passiva de partículas nas regiões tumorais, partículas com diâmetro menor que 200 nm é desejado. Em geral, as partículas com diâmetro médio de até 500 nm podem ser captadas pelas células alvo por endocitose. Dessa forma, no desenvolvimento de sistema de liberação para siRNA, partículas nanométricas são requeridas (REISCHL; ZIMMER, 2009).

O siRNA pode ser administrado sistêmica ou localmente. A administração sistêmica de siRNA deve lidar com diversos desafios além dos inerentes da aplicação de siRNA, como interação do siRNA com componentes do sangue, depuração renal e permeação dentro do tecido, além de problemas de toxicidade em tecidos não-alvo (PEER & LIEBERMAN, 2011; SARET et al., 2015). A administração local pode superar estes desafios e apresenta várias vantagens como possibilitar administração de doses menores, permitir liberação local e diminuir a imunoestimulação (CONDE et al., 2015; VICENTINI et al., 2013b).

Figura 5 - Esquematização do escape endossomal: (A) endossomo, (B) escape endossomal por desestabilização da membrana do endossomo, (C) escape endossomal pelo “efeito esponja de prótons” (Adaptado de Wan et al., 2013).

No que diz respeito a desordens relacionadas com a pele, tais como psoríase, dermatite atópica e doenças vesiculares adquiridas, a terapia à base de siRNA é uma forma de tratamento interessante uma vez que a pele é um órgão com elevada área superficial, de fácil acesso, não-invasiva, além de permitir o tratamento local destas doenças (GEUSENS *et al.*, 2009, VICENTINI *et al.*, 2013a, b).

Os sistemas de liberação de fármacos e a Nanotecnologia Farmacêutica apresentam efetivas estratégias para a administração de siRNA pela via tópica. Geusens e colaboradores (2009) sintetizaram e caracterizaram lipossomas ultra deformáveis contendo DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano) e colato de sódio, complexados com siRNA e investigaram a eficiência deste sistema de liberação *in vitro* em culturas primárias de melanócitos epidérmicos humanos. Kigasawa e colaboradores (2010), estudaram a permeação cutânea de siRNA associada a técnica de iontoforese. Adicionalmente, investigaram o efeito do siRNA nos níveis de interleucina-10, a qual encontra-se elevada na dermatite atópica, verificando a diminuição desta citocina com o tratamento sugerido.

Chong e coautores (2013), avaliaram o potencial de microagulhas de aço inoxidável revestidas de siRNA como um meio para liberá-lo na região alvo, a epiderme. Este foi o primeiro estudo a explorar a utilidade desse sistema para liberação de siRNA e observaram a deposição de siRNA dentro da pele e o silenciamento *in vivo* do gene (Luciferase/GFP) em questão. Já Vicentini e colaboradores (2013b) avaliaram nanodispersões de fases líquidas cristalinas como vetores não-virais, para liberação de siRNA na pele utilizando-se do polímero catiônico polietilenoimina (PEI) e do lipídeo catiônico oleilâmina (OAM) para complexação com siRNA. Os autores verificaram que os sistemas propostos aumentaram a penetração do siRNA na pele de camundongos *hairless* e promoveram a redução dos níveis da proteína modelo GAPDH sem causar irritação cutânea. Depieri et al., (2016) avaliaram esse mesmo sistema de aplicação tópica em modelo *in vivo* de psoríase e silenciaram a citocina IL-6. Ainda com um sistema de liberação semelhante, Petrilli e colaboradores (2016) funcionalizaram essas nanodispersões de fases líquidas cristalinas com peptídeos célula penetrantes e silenciaram a citocina TNF- α em modelo *in vivo* de inflamação tópica aguda induzida por derivado de forbol.

Dentre os polímeros carregados positivamente empregados na construção de carreadores não-virais, um dos mais utilizados é a polietilenoimina (PEI) (Figura 6). A PEI é um polímero sintético hidrossolúvel com elevada carga residual positiva em pH fisiológico devido aos grupamentos amino protonáveis em cada terceira posição (GUNTHER et al., 2011). Este polímero apresenta alta capacidade de se complexar com ácidos nucleicos por meio de interações eletrostáticas, promovendo a condensação da sua estrutura, com isso, diminui o seu tamanho e neutraliza a carga negativa, favorecendo a entrada na célula através da membrana celular e facilitando o escape

endossomal pelo “efeito esponja de prótons” (GUNTHER et al., 2011, YIN et al., 2014; GUO et al., 2010b).

Figura 6 - Estrutura química do PEI ramificado.

Há disponível no mercado o polímero catiônico PEI com diferentes massas moleculares e na forma linear ou ramificada, sendo as formas ramificada e de baixo peso molecular as mais indicadas para uma efetiva liberação intracelular. Estudos comparativos entre nanopartículas preparadas com PEI na forma linear ou ramificada mostraram que a forma ramificada foi mais adequada, pois produziu partículas mais estáveis, carregadas positivamente, que promoveram uma alta captação celular do siRNA e resultaram em um silenciamento gênico mais efetivo (KWOK & HART, 2011). O PEI ramificado de 25 kDa e o de 22 kDa são os mais eficientes. Porém, estes PEIs apresentam certa toxicidade celular (GUNTHER et al., 2011; LIU et al., 2011).

Vários sistemas com base lipídica foram desenvolvidos para veiculação de siRNA. Variações na composição dos lipídeos e nas propriedades estruturais das nanopartículas permitem a entrega específica do siRNA, além de influenciar sua liberação após a internalização celular (KAPOOR et al., 2012). As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas compostos por substâncias fisiologicamente toleradas e que já possuem aprovação para aplicação farmacológica em seres humanos. Seus componentes apresentam baixa citotoxicidade e possibilitam a obtenção de nanopartículas sem o uso de solventes. Além disso, são passíveis de esterilização e sua produção pode ser feita em larga escala o que é interessante para produção industrial (ASSIS et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; FRICKER et al., 2010; HU et al., 2008; MANDAL et al., 2013; MÜLLER et al., 2008).

Diante disso, com o intuito de reduzir a toxicidade do PEI e aproveitar suas qualidades para terapia gênica e concomitantemente utilizar-se das vantagens das NLSs, propôs-se a síntese de uma nanopartícula lipídica associada a esse polímero. A literatura atual mostra algumas propostas de sistemas de liberação tópica de siRNA. Entretanto, o uso de nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para complexação e liberação de siRNA na pele para o tratamento de doenças cutâneas, ainda é pouco explorado, o que demonstra o caráter inovador deste trabalho.

1.3 NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS POLIMÉRICO- LIPÍDICAS (NPL)

As NPLs são um sistema nanométrico emergente de administração de fármacos, feitas de polímeros e lipídios, compreendendo vantagens de ambos os materiais. As NPLs são sólidas à temperatura corpórea, semelhante às NLSs, mas diferente de nanopartículas essencialmente lipídicas, como os lipossomas que consistem de um núcleo aquoso rodeado por uma bicamada lipídica (WU, 2016; HADINOTO et al., 2013; ZHANG & ZHANG, 2010).

A coexistência de polímeros e lipídeos possuindo propriedades diferentes no mesmo material, como hidrofobicidade e a solubilidade em água, confere uma capacidade versátil às NPLs de encapsular diversos tipos de compostos. Em comparação com outros tipos de nanocarreadores, a NPL apresenta uma série de vantagens próprias, incluindo (1) ampla seleção de polímeros e lipídios biocompatíveis e inúmeras combinações lipídico-poliméricas, (2) fácil produção (3) superior capacidade de co-encapsulamento de agentes terapêuticos e de imagem com diferentes propriedades (WU, 2016). Além disso, em uma NPLs bem desenvolvida a porção polimérica encapsula fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis e fornece estruturas robustas, enquanto que a porção lipídica funciona como uma blindagem biocompatível, passível de modificações na superfície, funciona como uma barreira que evita o escape de fármacos encapsulados e oferece aumento na estabilidade sérica quando utilizado lipídeos PEGlados (CHEOW & HADINOTO, 2011).

Várias moléculas bioativas, como fármacos, genes, proteínas e moléculas com atividade funcionalizadora podem ser encapsuladas, adsorvidas ou ligadas de forma covalente nesse sistema híbrido. As escolhas comuns de polímeros incluem ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), policaprolactona (PCL), dextrano ou albumina devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e uso prévio em produtos aprovados. Os lipídeos utilizados são geralmente lipídeos conjugado ao polietilenoglicol

(PEG), ácidos graxos, lecitina, fosfolípidos zwitterionicos, 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).

A NPL foi inicialmente relatada no início dos anos 2000 para solucionar problemas de encapsulação de fármacos iônicos hidrossolúveis em matriz lipídica com o intuito de se encapsular adequadamente e promover a liberação sustentada desses medicamentos (WONG et al., 2004). Desde então, várias formulações de NPL têm sido desenvolvidas para encapsular quimioterápicos (ZHANG et al., 2016; SENDEL-TURK & CANAN HASCICEK, 2017), antibióticos (CHEOW & HADINOTO, 2011), co-encapsulação de um quimioterápico e um quimiossensibilizador (WONG et al., 2006), co-encapsulação com efeito sinérgico de dois quimioterápicos (LI et al., 2017; PRASAD et al., 2012) bupivacaína para anestesia local (MA et al., 2017), nicotina para tratar dependência química (ZHAO et al., 2017). As formulações de NPL também foram desenvolvidas para encapsular moléculas biologicamente ativas para terapia gênica e imunoterapia, incluindo siRNA (SHI et al., 2011; SHI et al., 2014) ou siRNA com um quimioterápico (ZHAO et al., 2015). É descrito que as NPLs aumentaram a eficiência de encapsulação, a liberação controlada, a absorção e a captação de fármacos quando comparados aos nanocarreadores lipídicos ou poliméricos isolados (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al, 2016).

As formulações de NPL relatadas podem ser divididas em duas categorias principais (Figura 7) (MANDAL et al., 2013; WU, 2016):

- NPL de matriz monolítica, onde o polímero e os fármacos são distribuídos de forma homogênea na matriz lipídica sólida, são também conhecidas como nanopartículas mistas lipídico-poliméricas (ZHANG et al, 2016; PRASAD et al., 2013; PRASAD et al., 2012; ZHANG et al., 2008; WONG et al., 2006; WONG et al., 2004).

- NPL núcleo-casca, onde o núcleo polimérico contendo fármaco é coberto por uma camada de fosfolípido, são também conhecidas como nanopartículas lipídico-poliméricas (HADINOTO et al., 2013; CHEOW & HADINOTO, 2011; SHI et al., 2011; ZHANG & ZHANG, 2010; SALVADOR-MORALES et al., 2009).

Nas NPLs de matriz monolítica, geralmente utiliza-se polímeros aniônicos ou catiônicos para se complexarem com fármacos de carga oposta e dessa forma aumentar sua eficiência de encapsulação. Para carregar um fármaco catiônico, por exemplo, doxorrubicina HCl ou verapamil HCl, foi utilizado um polímero aniônico, tal como sulfato

de dextrana ou polímero de óleo de soja, para neutralizar a carga do fármaco e dessa forma incorporá-lo na matriz lipídica, utilizando Tween 80 ou Pluronic 188 como tensoativos. O método de produção empregado para esse tipo de nanopartícula envolve microemulsificação a quente empregado alto cisalhamento por meio de Ultra-Turrax ou Ultrassom de ponta, utilizando pouco ou nenhum solvente orgânico. Em caso de co-encapsulação os fármacos podem ser não-iônicos ou hidrofóbicos, além disso existe a possibilidade de produção de nanopartículas furtivas a partir de lipídeos PEGlados (MANDAL et al., 2013; WU, 2016; ZHANG et al., 2016).

Figura 7 - Ilustração esquemática da estrutura e preparação dos principais tipos de NPLs. (A) matriz monolítica e (B) núcleo-casca (Adaptado de WU, 2016).

A NPL núcleo-casca utiliza a vantagem do núcleo polimérico para liberação do fármaco sustentada e camada (mono ou bi) lipídica semelhante a superfície lipossomal. As cadeias de PEG também podem ser conjugadas na superfície para obtenção de nanopartículas furtivas. Essa NPL normalmente é preparada por um método que envolve duas etapas: O polímero (PLGA, por exemplo) e o fármaco são solubilizados juntos em um solvente orgânico e por emulsificação por evaporação do solvente tem-se a formação do núcleo polimérico contendo o fármaco encapsulado. Esse núcleo polimérico então é misturado com filme lipídico ou lipossomas pré-formados e reidratados para formar as bicamadas lipídicas (MANDAL et al., 2013; WU, 2016). É descrito também a produção dessas nanopartículas em um só processo, por nanoprecipitação (MA et al., 2017; LI et al., 2017; ZHANG et al., 2008).

Ao longo dos últimos, sistemas de liberação à base de NPLs tem-se desenvolvido rapidamente para alcançar uma terapia eficaz e segura para uso clínico. Todas as formulações de NPL relatadas são feitas por métodos de preparação simples, utilizando-se de polímeros, lipídios e tensoativos que foram utilizados em produtos farmacêuticos aprovados, ou geralmente considerados como seguros. Dessa forma, o presente trabalho propõe um estudo sistemático na busca dos componentes e técnica de preparo ideal para o desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da atividade de um sistema nanoparticulado híbrido polimérico lipídico do tipo matriz monolítica, utilizando-se de PEI como polímero catiônico e matriz lipídica (NLS-PEI) para complexação ao siRNA com baixo potencial irritativo e alta estabilidade, o qual permita sua administração para tratamento de doenças cutâneas.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos permite-se concluir:

- A otimização da produção das NLS-PEI foi uma ferramenta interessante para a avaliação da influência de fatores no processo de produção das nanopartículas e da sua composição nas propriedades físicas das mesmas, permitindo a escolha de carreadores estáveis e com composição interessante para a veiculação do siRNA;
- As nanopartículas preparadas nesse estudo, compostas por Compritol® 888 ATO (2,0%), Poloxamer 188 (1,5%) e PEI (0,15 e 0,25%), foram preparadas pelo método de emulsão à quente e ultra-turrax/sonicação. As NLS-PEI apresentaram-se esféricas com superfície lisa e um tamanho médio de 165 nm, baixo índice de polidispersão ($<0,3$), potencial zeta positivo e apresentaram estabilidade físico-química no período avaliado (90 dias). O polímero catiônico, PEI, interage com todos os componentes da nanopartícula, o que a caracteriza como nanopartícula híbrida polimérico-lipídica de matriz monolítica;
- As NLS-PEIs foram capazes de complexar o siRNA na concentração final de 10 μ M, protegendo-o da degradação como mostrado no ensaio usando 25% de SBF e liberá-lo de forma intacta, etapas essas importantes no processo de RNAi e que foram alcançadas pelas NLS-PEIs;
- A padronização da avaliação *in vitro* para as NLS-PEIs em queratinócitos e fibroblastos possibilitou a obtenção dos parâmetros de tratamento relacionados à densidade celular, ao tempo de tratamento e à diluição da formulação para serem aplicados nas células, evidenciando que a citotoxicidade é proporcional ao volume de NLS-PEI administrado às células;
- As NLS-PEIs foram eficazes em promover uma elevada captação das moléculas de siRNA em linhagem celular de queratinócitos e fibroblastos e a quantidade de siRNA internalizado foi dependente da linhagem celular;
- O siRNA liberado da NLS-PEI foi capaz de promover silenciamento da expressão genica de firefly luciferase (gene exógeno modelo) nas células HaCaT;
- Em ensaios de penetração cutânea *in vitro*, foi evidenciado o aumento da penetração cutânea do siRNA complexado com as NLS-PEI;
- A avaliação *in vivo* em modelo de inflamação cutânea aguda e crônica induzida por TPA, com camundongos *hairless*, demonstrou a eficácia do tratamento com a NLS-PEI contendo siTNF- α pela redução dos níveis da citocina TNF- α e do RNAm

correspondente em comparação com a pele dos animais expostos ao pré-tratamento com a NLS-PEI vazia ou com a NLS-PEI contendo ns-siRNA e TPA nas mesmas doses. Também foi eficaz na melhora fenotípica dos animais, com redução de rubor, descamação, acantose e redução da espessura da epiderme (ensaio crônico). Na dosagem de colágeno total, os tratamentos desenvolvidos não promoveram danos cutâneos relacionados a resistência e elasticidade da pele;

- A aplicação tópica da NLS-PEI *in vivo* foi eficaz em promover a penetração das moléculas de siRNA nas camadas mais profundas na pele inflamada e na epiderme na pele integra.

Diante disso, conclui-se que foi desenvolvido e caracterizado nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas de matriz monolítica. Estas partículas demonstraram ser sistemas carreadores de siRNA promissores para a administração tópica de siRNA para tratamento de doenças cutâneas, uma vez que foi capaz de superar as barreiras de administração tópica, bem como complexar, proteger contra a degradação enzimática e promover a captação celular das moléculas de siRNA e liberar essas moléculas intactas que, eficientemente, silenciaram seu alvo específico por meio da degradação do RNAm pelo processo de interferência por RNA.

Esses resultados abrem várias possibilidades de se ter um sistema para administração de siRNAs para diferentes alvos e com capacidade de co-encapsulação de outras moléculas ativas, fazendo desta nanopartícula híbrida um sistema multifuncional com possível efeito sinérgico no tratamento de diversas patologias.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Active Standard ASTM E2834 | Developed by Subcommittee: E56.02. Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). **Book of Standards Volume: 14.02.** 2012.

AKINC, A.; THOMAS, M.; KLIBANOV, A. M.; LANGER, R.; Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. **Journal of Gene Medicine**, v.7, n.5, p.657-663, 2005.

ALDAWSARI, M.; CHOUGULE, M. B.; BABU, R. J. Progress in Topical siRNA Delivery Approaches for Skin Disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v.21, p.000-000, 2015.

ALIABADI, H. M.; LANDRY, B.; SUN, C.; TANG, T.; ULUDAG, H. Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: Where do we stand? **Biomaterials**, v. 33, p. 2546 – 2569, 2012.

AL-SAIKHAN, F. I. The gene therapy revolution in ophthalmology. **Saudi Journal of Ophthalmology**, 2013.

ALVES, E. A. & GUIMARÃES, A. C. R. Conceitos e Métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2 / cp 5 – Cultivo Celular. - Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/ Instituto Oswaldo Cruz, 2010.

ANDREWS, G. P.; ZHAI H.; TIPPING S.; JONES D. S. Characterisation of the Thermal, Spectroscopic and Drug Dissolution Properties of Mefenamic Acid and Polyoxyethylene–Polyoxypropylene Solid Dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 98, n.12, p. 4545-4556, 2009.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. da R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of food technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

ATTAMA, A.A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 315, n. 1-3, p. 189–195, 2008.

BARBIERI, J. S.; WANAT, K.; SEYKORA, J. Skin: Basic Structure and Function. **Pathobiology of Human Disease**, p. 1134–1144, 2014.

BIVAS-BENITA, M.; ROMEIJN, S.; JUNGINGER, H. E.; BORCHARD, G. PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.1–6, 2004.

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.; 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, p.72–82, 2014.

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** XXXX, XXX, XXX-XXX, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01141, 2017.

BOSEA, S.; DUC, Y.; TAKHISTOV, P.; MICHNIAK-KOHN, B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.441, p.56–66, 2013.

BOUDREAU, R. L.; MARTINS, I.; DAVIDSON, B. L. Artificial MicroRNAs as siRNA Shuttles: Improved Safety as Compared to shRNAs *In vitro* and *In vivo* **Molecular Therapy**, v. 17, n. 1, p.169–175, 2009.

BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to intertechnique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 387, p. 35-42, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 1. ed. Brasília, DF, 2004.

BRUBACH, J.; JANNIN, V.; MAHLER, B.; BOURGAUX, C.; LESSIEUR, P.; ROY, P.; OLLIVON, M. Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 336, p. 248-256, 2007.

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

CAPECCHI, M. R.; Altering the Genome Homologous Recombination. **Science**, v.244, n.1, p.1288-1292, 1989.

CARDARELLI, F.; DIGIACOMO, L.; MARCHINI, C.; AMICI, A.; SALOMONE, F.; FIUME, G.; ROSSETTA, A.; GRATTON, E.; POZZI, D. & CARACCIOLO, G. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine based transfection reagents and its implication for gene delivery. **Scientific Reports** DOI: 10.1038/srep25879 2016.

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

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

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.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, **Methods in Molecular Biology**, v.697, p. 63-70, 2010

COLOME, L.M.; RAFFIN, R.P.; ASSUMPCAO, E.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Theospheres based on theobroma grandiflorum seed butter: development of innovative nanoparticles for skin application. **SOFT MATERIALS**, v. 8, p. 72-88, 2010.

CONDE, J.; AMBROSONE, A.; HERNANDES, Y.; TIAN, F.; MCCULLY, M.; BERRY, C. C.; BAPTISTA, P. V.; TORTIGLIONE, C.; DE LA FUENTE, J. M. 15 years on siRNA delivery: Beyond the State of the art on inorganic nanoparticles for RNAi therapeutics. **Nano Today**, v.10, p.421-450, 2015.

CZEKANSKA, E. M. Assessment of Cell Proliferation with Resazurin-Based Fluorescent Dye. Springer Protocol. **Mammalian Cell Viability**, v 740, p 27-32, 2011.

DALBY, B.; CATES, S.; HARRIS, A.; OHKI, E. C.; TILKINS, M. L.; PRICE, P. J.; CICCARONE, V. C. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. **Methods**, v.33, p.95–103, 2004.

DAUDÉN, E.; CASTAÑEDA, S.; SUÁREZ, C.; GARCÍA-CAMPAYO, J.; BLASCO, A. J.; AGUILAR, M. D.; FERRÁNDIZ, C.; PUIG, L.; SÁNCHEZ-CARAZO, J. L. Integrated Approach to Comorbidity in Patients With Psoriasis. **Actas Dermosifiliograficas**, v.103(Supl 1), p.1–64, 2012.

DAVID, A. L. & PEEBLES, D. Gene therapy for the fetus: is there a future? **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 22, Nº. 1, p. 203–218, 2008

DE LOUISE, L. A. Applications of Nanotechnology in Dermatology. **Journal of Investigative Dermatology**. v.132, p.964–975, 2012.

DE PAULA, D.; BENTLEY, M. V. L. B. MAHATO, R. I. Hydrophobization and Bioconjugation for Enhanced siRNA Delivery and Targeting. **RNA. Ribonucleic Acid**, v. 13, p. 431-456, 2007.

DEPIERI, L. V. Dissertação de mestrado. Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos para veiculação de siRNA na terapia genica. FCFRP-USP, 2012.

DERMATOLOGIA, S.B. **Censo Dermatológico 2006**. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/atualidade/censo.html>>. Consulta em abril de 2013.

ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 47–54, 1991.

ERDŐ, F.; HASHIMOTO, N.; KARVALY, G.; NAKAMICHI, N.; KATO, Y. Critical evaluation and methodological positioning of the transdermal microdialysis technique. A review. **Journal of Controlled Release**. v.233, p.147–161, 2016.

FANG, J.-Y; FANG, C.-L; LIU, C.-H.; SU, Y.-H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.70, p.633–640, 2008.

FELETAR, M.; FOLEY, P.; BROWN, M. Developments in psoriasis and psoriatic arthritis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 1, p. 47-54, 2008.

FERREIRA, D. A. BENTLEY, M. V. L. B.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. Cryo-TEM investigation of phase behaviour and aggregate structure in dilute dispersions of monoolein and oleic. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p. 203-212, 2006.

FILIPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, 2010.

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.

FRANÇA, N. R.; JUNIOR, D. M.; LIMA, A. B.; PUCCI, F. V. C.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n.6, p.695-702, 2010.

FREITAS, C.; MULLER, R. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 47, p. 125- 132, 1999

FRICKER, G.; KROMP, T.; WENDEL, A.; BLUME, A.; ZIRKEL, J.; REBMANN, H.; SETZER, C.; QUINKERT, R.-O.; MARTIN, F.; MÜLLER-GOYMANN, C. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 1469–1486, 2010.

GARY, D. J.; PURI, N.; WON, Y. Y. Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v.121, p.64–73, 2007.

GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow distribution. **US Patent Nº 5250236**, 1993.

GEUSENS, B.; LAMBERT, J.; DE SMEDT, S.C.; BUYENS, K.; SANDERS, N.N.; VAN GELE, M. Ultradeformable cationic liposomes for delivery of small interfering RNA (siRNA) into human primary melanocytes. **Journal of Controlled Release**, v. 133, p. 214–220, 2009.

GRACE R. NAKAYAMA, MAUREEN C. CATON, MICHAEL P. NOVA, ZAHRA PARANDOOSH. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v.204, p.205–208, 1997.

GUHAGARKAR, S. A.; MALSHE, V. C.; DEVARAJAN, P. V. Nanoparticles of Polyethylene Sebacate: A New Biodegradable Polymer. **PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 935-942, 2009.

GUNTER, M.; LIPKA, J.; MALEK, A.; GUTSCH, D.; KREYLING, W.; AIGNER, A. Polyethilenimines 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, J.; BOURRE, L.; SODEN, D. M.; O'SULLIVAN, G. C.; O'DRISCOLL, C. Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? **Biotechnology Advances**, v.29, p.402–417, 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.

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.

HAMDANI, J.; MOËS A. J.; AMIGHI K. Physical and thermal characterisation of Precirol® and Compritol® as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled-release matrix pellets. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 260, p. 47–57, 2003.

HATTORI, Y.; KAWAKAMIM, S.; NAKAMURA, K.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by *in vivo* gene delivery with mannosylated lipoplex via the intraperitoneal route. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.318, p. 828-834, 2006.

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.

HIPPALGAONKAR, K.; ADELLI, G. R.; HIPPALGAONKAR, K.; REPKA, M. A.; MAJUMDAR, S. Indomethacin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Ocular Delivery: Development, Characterization, and *In vitro* Evaluation. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, nº 2, 2013

HSU, J-P; NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 259 p.374–381, 2003.

HU, F.-Q.; ZHANG, Y.; DU, Y.-Z.; YUAN, H. Nimodipine loaded lipid nanospheres prepared by solvent diffusion method in a drug saturated aqueous system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 348, p. 146-152, 2008.

HUNG, C. F.; LU, K. C.; CHENG, T. L.; WU, R. H.; HUANG, L. Y.; TENG, C. F.; CHANG, W. T. A novel siRNA validation system for functional screening and identification of effective RNAi probes in mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.346, p.707-720, 2006.

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

JACKSON, A. L.; LINSLEY, P. S. Recognizing and avoiding siRNA offtarget effects for target identification and therapeutic application. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, p. 57 – 67, 2010.

KALAIARASU, L. P.; SUBRAMANIAN, V.; SOWNDHARRAJAN, B.; VELLAICHAMY, E. Insight into the Anti-Inflammatory Mechanism of Action of Atrial Natriuretic Peptide, a Heart Derived Peptide Hormone: Involvement of COX-2, MMPs, and NF-kB Pathways. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. DOI 10.1007/s10989-016-9525-9

KALINOWSKI, F. C.; GILES, K. M.; CANDY, P. A.; ALI, A.; GANDA, C.; EPIS, M. R.; WEBSTER, R. J.; LEEDMAN, P. J. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and Erlotinib Sensitivity in Head and Neck Cancer Cells by miR-7. **PLoS ONE**, v.7, n.10, p.e47067, 2012.

KANG H.; ARMENTROUT R. S.; WANG J.; LONG T. E. Synthesis and characterization of ionic and non-ionic terminated amorphous poly(ethylene isophthalate). **Functional Condensation Polymers**. Ch18, p 249-261, 2002.

KHALIL, I. A.; KOGURE, K.; AKITA, H.; HARASHIMA, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. **Pharmacological Reviews**, v.58, p.32-45, 2006.

KHATTAR, H.; SINGH, S.; MURTHY, R. S. R. Formulation and characterization of nano lipid carrier dry powder inhaler containing ciprofloxacin hydrochloride and N-acetyl cysteine. **International Journal of Drug Delivery**, v. 4, p. 316-325, 2012

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.

KIM, Y-M.; PARK, M-R.; SONG, S-C. An injectable cell penetrable nano-polyplex hydrogel for localized siRNA delivery. **Biomaterials**. v.34, p.4493-4500, 2013.

KONG, B.; SEO, J. H.; GRAHAM, L. M.; LEE, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine** (Lond), v.6, n.5, p.929–941, 2011

KOVACEVIC, A.; SAVIC, S.; VULETA, G.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 406, p. 163-172, 2011.

KUSHWAHA, A. K.; VUDDANDA, P. R.; KARUNANIDHI, P.; SINGH, S. K.; SINGH, S. Development and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of Raloxifene Hydrochloride for Enhanced Bioavailability. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Basic Science, Medicine** v. 41, n. 6, p. 317 – 320, 2013.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **MEDICINE**. v.45, p.347-351, 2017.

LI, J.; CHEN, Y-C.; TSENG, Y-C.; MOZUMDAR, S.; HUANG, L. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. **Journal of Controlled Release** v.142, p.416–421, 2010.

LI, C.; GE, X.; WANG, L. Construction and comparison of different nanocarriers for co-delivery of cisplatin and curcumin: A synergistic combination nanotherapy for cervical cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.86, p.628–636, 2017.

LIANG, B., HE, M-L., XIAO, Z-P , LI, Y., CHAN, C-Y, KUNG, H-F, SHUAI, X-T, PENG, Y. Synthesis and characterization of folate-PEG-grafted-hyperbranched-PEI for tumor-targeted gene delivery. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.367, p.874–880, 2008.

LIN, Y. K.; YANG, S. H.; CHEN, C. C.; KAO, H. C.; FANG, J. Y. Using imiquimod-induced psoriasis-like skin as a model to measure the skin penetration of anti-psoriatic drug. **PLoS ONE**, v.10, n.9, p.1-19, 2015.

LIU W. L.; STEVENSON, M.; SEYMOUR, L. W.; FISHER, K. D. Quantification of siRNA using competitive qPCR. **Nucleic Acids Research**, v.37, n.1, p.e4, 2009.

LOPES, L. B. ; FURNISH, E. ; KOMALAVILAS, P.; BRANDON, S. L. ; PANITCH, A.; BENTLEY, M. V. L. B; BROPHY, C. M . Enhanced skin penetration of P20 phosphopeptide using protein transduction domains. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** , v. 31, p. 81-89, 2008.

LOPES, L. B.; FERREIRA, D. A.; PAULA, D. de ; GARCIA, M. T. J. ; THOMAZINI, J. A.; FANTINI, M. C.; 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 permeation of cyclosporin A. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, p. 1332-1342, 2006.

MA, P.; LI, T.; XING, H.; WANGD, S.; SUNE, Y.; SHENG, 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.

MAK, R.; HUNDHAUSEN, C.; NESTLE, F. Progress in Understanding the Immunopathogenesis of Psoriasis Progress in Understanding the Immunopathogenesis of Psoriasis. **Actas Dermosifiliográfica**, v. 100, n. 2, p. 2-13, 2009.

MALVERN STRUMENTS. Disponível em:
<<http://www.malvern.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/>>
Acessado em 19 de agosto 2016.

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.; ADAMI, L.F.; CAVERZAN, J. ; HUBER, S. C.; MISSET, T.; DEN HERTOOG, J. ; FERREIRA, C. V.; DURÁN, N. Solid Lipid Nanoparticles as Sunscreen Carrier System and its Toxicity in Zebrafish Embryos. In: The IASTED International Conference on Nanotechnology and Applications, **Creta. Nanotechnology and Applications**. Calgary: Acta Press: A Scientific and Technical Publishing Company; v. 615, 2008

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.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165-196, 2001.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. "Solid Lipid Nanoparticles ☆ Production , Characterization and Applications." **Advanced Drug Delivery Reviews** v.64, p.83–101, 2012.

MÜLLER, R. H.; LUCKS, J. S. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN). **European Patent Nº 0605497**. Germany, 1996.

MÜLLER, R. H.; RUNGE, S. A.; RAVELLI, V.; THÜNEMANN, A. F.; MEHNERT, W.; SOUTO, E. B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 535-544, 2008.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**. v.71, p.1331–1336, 2006.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **The Plant Cell**, v.2, n.4. p.279-289, 1990.

NAVARRO, G.; ESSEX, S.; SAWANT, R. R.; BISWAS, S.; NAGESHA, D.; SRIDHAR, S.; ILARDUYA, C. T.; TORCHILIN, V. P. Phospholipid-modified polyethylenimine-based nanopreparations for siRNA-mediated gene silencing: Implications for transfection and the role of lipid components. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.10, p. 411–419, 2014.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011

NESTLE, F.; KAPLAN, D.; BARKER, J. Psoriasis: mechanisms of disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 1710, p. 496-509, 2009.

NEWA M.; BHANDARI K. H.; LI D. X.; KWON T. H.; KIM J. A.; YOO B. K.; WOO J. S.; LYOO W. S.; YONG C. S.; CHOI H. G.; Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with Poloxamer 188® . **International Journal of Pharmaceutics**. v. 343, p. 228-237, 2007.

OH, Y.; PARK, T.G. siRNA delivery systems for cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p.850-862, 2009.

OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C-H.; MULLER, R. H.; KNEUER, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. **Journal of Controlled Release**. v.77, p. 345–355, 2001.

OLBRICH, C.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN) effect of surfactants, storage time and crystallinity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.237, p.119–128, 2002.

OLIVEIRA, S.; FRETZ, M. M.; HØGSET, 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.

OVERHOFF, M.; WUNSCH, W.; SCZAKIEL, G. Quantitative detection of siRNA and single-stranded oligonucleotides: relationship between uptake and biological activity of siRNA. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.21, p.e170, 2004.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v.366, p.170–184, 2009.

PESTANA, K. C.; FORMARIZ, T.P.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 253–259, 2008.

PETERSEN, H.; FECHNER, P. M.; FISCHER, D.; KISSEL, T. Synthesis, Characterization, and Biocompatibility of Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) Block Copolymers. **Macromolecules**, v. 35, p. 6867-6874, 2002.

PETRILLI, R., J. O. ELOY, F. S. G. PRAÇA, J. O. DEL CIAMPO, M. A. C. FANTINI, M. J. V. FONSECA, AND M. V. L. B. BENTLEY. 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.1–13, 2016

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.

PRASAD, P.; CHENG, J.; SHUHENDLER, A.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. A novel nanoparticle formulation overcomes multiple types of membrane efflux pumps in human breast cancer cells. **Drug Delivery and Translational Research**. v.2, p.95–105, 2012.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J.- M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063–1072, 2008.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, p.470–491, 2011.

PUIG, L.; JULIÀ, A.; MARSAL, S. The Pathogenesis and Genetics of Psoriasis. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 105, n. 6, p.535---545, 2014

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 Controlled Release**, v. 159, p. 251-260, 2012.

REISCHL, D.; ZIMMER, M.S.A. Drug delivery os siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. **Nanomedicine**, v. 5, p. 8-20, 2009.

RIBEIRO, C. Cosmetologia aplicada a dermocosmética. 2ª edição, São Paulo: **Pharmabooks**, 2010.

RIDOLFIA, D. M.; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.93, p.36–40, 2012.

RUSSELL W. M. S.; BURCH, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique. 1959

SAWANT, R. R.; SRIRAMAN, S. K; NAVARRO, N.; BISWAS, S.; DALVI, R. A.; TORCHILIN, V. P. Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. **Biomaterials**, v.33, p. 3942-3951, 2012.

SCHATZLEIN, A. G.; UCHEGBU, I. F. Polymers in Drug Delivery. 1ª edição: **CRC Press**, 2006.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1150 – 1158, 2006.

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.16e27, 2017.

SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.47, n.2-3, p.229-250, 2001.

SHI, J.; XIAO, Z.; VOTRUBA, A. R.; VILOS, C.; FAROKHZAD, O. C. Differentially Charged Hollow Core/Shell Lipid–Polymer–Lipid Hybrid Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery. **Chem.** v.123, p.7165 –7169, 2011.

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.

SIDDIQUI, A.; ALAYOUBI, A.; EL-MALAH, Y.; NAZZAL, S. Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM). **Pharmaceutical Development Technology**.; vol. 19, p. 342-346, 2014.

SIFUENTES-ROMERO, I.; MILTON, S. L.; GARCIA-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.

SITTERBERG, J.; ÖZCETIN, A.; EHRHARDT, C.; BAKOWSKY, U. Utilizing atomic force microscopy for the characterization of nanoscale drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.74, p.2–13, 2010.

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.

TAKAHASHI, K.; KATO, H.; SAITO, T., MATSUYAMA, S., KINUGASA, S. Precise Measurement of the Size of Nanoparticles by Dynamic Light Scattering with Uncertainty Analysis. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 25, p. 31-38, 2008.

THADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formations and stability of nanoemulsions. **Advance in Colloid and Interface Science**, v. 108 – 109, p. 303 – 318, 2004.

ULASOV, A. V.; KHRAMTSOV, Y. V.; TRUSOV, G. A.; ROSENKRANZ, A. A.; SVERDLOV, E. D.; SOBOLEV, A. S. Properties of PEI-based Polyplex Nanoparticles That Correlate With Their Transfection Efficacy **Molecular Therapy**, v.19, no. 1, p.103–112, 2011

VAN DER KROL, A. R.; MUR, L. A.; BELD, M.; MOL, J. N. M.; 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, n.4, p.291-299, 1990.

VICENTINI, F. T. M. C.; BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DEPIERI, L. V.; MACEDO MANO, D.; 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.; CIAMPO, J. O. D.; 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 Biopharma**, v.83, p.16–24, 2013b.

VITONYTE, J.; MANCA, M. L.; CADDEO, C.; VALENTI, D.; PERIS, J. E.; USACH, I.; NACHER, A.; MATOS, M.; GUTIÉRREZ, G.; ORRÙ, G.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X.; FADDA, A. M.; MANCONI, M. Bifunctional viscous nanovesicles co-loaded with resveratrol and gallic acid for skin protection against microbial and oxidative injuries. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.114, p.278–287, 2017.

WAN, C.; ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. **Drug Delivery and Translacional Research**, 2013

WHITEHEAD, K.A.; LANGER, R.; ANDERSON, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 129-139, 2009.

WOLFRUM, C.; SHI, S.; JAYAPRAKASH, K. N.; JAYARAMAN, M.; WANG, G.; PANDEY, R. K.; RAJEEV, K. G.; NAKAYAMA, T.; CHARRISE, K.; NDUNGO, E. M.; ZIMMERMANN, T.; KOTELIANSKY, V.; MANOHARAN, M. & STOFFEL, M. Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. **Nature Biotechnology**, v.25, n.10, p.1149-1157, 2007.

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.

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.

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.

ZAKREWSKY, M.; KUMAR, S.; SAMIR MITRAGOTRI. Nucleic acid delivery into skin for the treatment of skin disease: Proofs-of-concept, potential impact, and remaining challenges. **Journal of Controlled Release** xxx (2015) xxx–xxx

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, R. X.; CAI, P.; ZHANG, T.; CHEN, K.; LI, J.; CHENG, J.; PANG, K. S.; ADISSU, H. A.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Polymer–lipid hybrid nanoparticles synchronize pharmacokinetics of co-encapsulated doxorubicin–mitomycin C and enable their spatiotemporal co-delivery and local bioavailability in breast tumor. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v.12, p.1279–1290, 2016.

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.13e25, 2015.

ZHU, L.; PERCHE, F.; WANG, T.; TORCHILIN, V. P. Matrix metalloproteinase 2-sensitive multifunctional polymeric micelles for tumor-specific co-delivery of siRNA and hydrophobic drugs. **Biomaterials**, v.35, p. 4213-4222, 2014.