

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado contendo *pool* de siRNAs associados a agente antitumoral como uma abordagem terapêutica multifuncional para o câncer de pele

Juliana Santos Rosa Viegas

Ribeirão Preto 2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado contendo *pool* de siRNAs associados a agente antitumoral como uma abordagem terapêutica multifuncional para o câncer de pele

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

Orientada: Juliana Santos Rosa Viegas

Orientadora: Prof. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Viegas, Juliana Santos Rosa

Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado contendo *pool* de siRNAs associados a agente antitumoral como uma abordagem terapêutica multifuncional para o câncer de pele, 2022.

203 p.:il.;30cm.

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: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

Carreador Lipídico Nanoestruturado. 2. Terapia gênica.
 siRNA. 4. Câncer de pele.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Juliana Santos Rosa Viegas

Título do trabalho: Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado contendo pool de siRNAs associados a agente antitumoral como uma abordagem terapêutica multifuncional para o câncer de pele

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.

Aprovado em:		
	Banca Examinadora	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me concedeu a vida e guia meu caminho.

Agradeço imensamente aos meus pais, Márcia e Luiz Carlos, meu irmão Gustavo, por sempre buscarem me entender e apoiar minhas escolhas e por serem minha fonte inesgotável de força. Agradeço ao meu marido, Felipe, por nunca faltar em momento algum, por me respeitar e apoiar incondicionalmente.

À minha orientadora, Maria Vitória Lopes Badra Bentley, por investir e depositar confiança em meu trabalho durante todos estes anos. Aos colegas que tive o privilégio de conhecer e conviver ao longo desta caminhada, especialmente Marcelo Kravics, Marcela Tavares, Larissa Tofani, Juliana Abriata, Murilo Davoli, Thais Procópio, Marcel Nani, Natália de Paula.

Aos funcionários e técnicos da FCFRP e do laboratório NanoGeneSkin que contribuíram com a construção e aprimoramento do meu trabalho, especialmente ao José Orestes.

Aos professores, Marco Andrey Cipriani Frade pela contribuição e apoio em meu trabalho, e Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini pela mentoria no estágio em docência.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e Pós Graduação e seus respectivos funcionários pelo investimento em minha educação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (#2019/04448-2) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

"If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk then crawl, but whatever you do you have to keep moving forward."

(Martin Luther King Jr.)

Resumo

Viegas, J. S. R. Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado contendo pool de siRNAs associados a agente antitumoral como uma abordagem terapêutica multifuncional para o câncer de pele. 2022. 203 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O câncer de pele avança a cada ano no que diz respeito ao número de casos em todo o mundo, principalmente em países onde há predominância de caucasianos. Os tratamentos disponíveis estão cada vez menos efetivos devido às inúmeras mutações e para superar tais desafios, as terapias de silenciamento gênico têm sido amplamente adotadas. No presente trabalho desenvolveu-se um carreador lipídico nanoestruturado (CLN) contendo 5-Fluororuracil e pool de siRNAs, (siRNA Gli-1, siRNA EGFR e siRNA Bcl-2) de modo a atuar em diferentes vias do câncer de pele. O CLN foi desenvolvido em homogeneizador de alta pressão e otimizado por planejamento experimental. Foi caracterizado e apresentou-se com diâmetro de partícula entre 200 e 250 nm, índice de polispersão menor que 0,3, potencial zeta de 49 mV, número de nanopartículas 10¹²/ mL. Foram realizados estudos iniciais de escalonamento de 20 mL até 200 mL, apresentando-se em todos os volumes as mesmas caractetísticas físicoquimicas. A complexação com os siRNAs ocorreu nas razões N/P 2 para os siRNAs controle e Bcl-2, e N/P 5 para siRNA Gli-1 e EGFR, e todos descomplexaram eficientemente com competição aniônica utilizando heparina. A liberação de 5-FU deu-se pela cinética de Higuchi, liberando cerca de 60 a 80% de 5-FU em 8 horas de forma sustentada. Estudos cutâneos *in vitro* e *ex* vivo indicaram que o 5-FU retem-se majoritariamente da epiderme. Além disso não causa danos teciduais e reduz a descamação do estrato córneo. Estudos celulares (2D e esferoides 3D) indicaram que o sistema em si é pouco tóxico. porém quando associado aos agentes ativos reduz significantemente a viabilidade celular. A linhagem celular A431 e A375 foram as linhagens mais suscetíveis à combinação CLN 5-FU + siRNA Bcl-2, as linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu, tiveram sua viabilidade reduzida frente a combinação CLN 5-FU + pool, evidenciando serem mais agressivas e resistentes. O uptake celular ocorreu eficientemente nas linhagens e a via de internalização determinada foi endocitose dependente por clatrina e uma parte minoritária por caveolina. Determinou-se in vitro, que o CLN multifuncional contendo 5-FU + pool siRNA foi eficiente em conter a migração das linhagens bem como em conter a invasividade da linhagem 1205Lu. A combinação CLN 5-FU + siRNA Bcl-2, avaliada in vivo em modelo xenotransplante da linhagem A431, mostrou-capaz de suprimir o crescimento tumoral com infiltração inflamatória controlada (baixos índices de mieloperoxidase, N-acetilglucosaminidase e TNF-α). Além disso, sinalizando apoptose tumoral eficaz, knockdown de Bcl-2 e negatividade para remodelação da matriz extracelular.

Palavras-chave: Carreador Lipídico Nanoestruturado, Terapia gênica, siRNA Bcl-2, siRNA Gli-1, siRNA EGFR, 5-fluorouracil, Câncer de pele.

Abstract

Viegas, J. S. R. Development of a nanostructured lipid carrier containing a pool of siRNAs associated with an antitumor agent as a multifunctional therapeutic approach for skin cancer. 2022. 203 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Skin cancer advances in number of cases worldwide, especially in countries where there is a predominance of Caucasians. The available treatments are less effective due to the mutations and to overcome these challenges, gene silencing therapies have been widely adopted. In the present work, a nanostructured lipid carrier (NLC) containing 5-Fluororuracil and a pool of siRNAs (siRNA Gli-1, siRNA EGFR and siRNA Bcl-2) was developed in order to act on different skin cancer pathways. The NLC was developed in high pressure homogenizer and optimized by experimental design. NLC was characterized and presented diameter between 200 - 250 nm, polydispersion index less than 0.3, zeta potential of 49 mV, and number of nanoparticles 10¹²/mL. Scaling up studies from 20 mL to 200 mL were performed, presenting the same physicochemical characteristics in all volumes. Complexation with the siRNAs occurred at N/P 2 ratio for control and Bcl-2 siRNAs, and N/P 5 ratio for siRNA Gli-1 and EGFR, and all decomplexed efficiently with anionic competition using heparin. The release of 5-FU occurred by Higuchi kinetics, releasing about 60 to 80% of 5-FU in 8 hours in a sustained manner. In vitro and ex vivo cutaneous studies indicated that 5-FU is mostly retained in the epidermis. In addition, it does not cause tissue damage and reduces the desquamation of the stratum corneum. Cellular studies (2D and 3D spheroids) indicated that the system itself is not toxic, but when associated with active agents it significantly reduces cell viability. The cells A431 and A375 were the most susceptible lines to the combination NLC 5-FU + Bcl-2 siRNA, the cells Sk-mel-103 and 1205Lu had their viability reduced for NLC 5-FU + pool, showing that they are more aggressive and resistant. Cell uptake occurred efficiently in the cells and the internalization pathway determined was endocytosis dependent by clathrin and a minority by caveolin. It was determined in vitro that the multifunctional NLC containing 5-FU + pool siRNA decreased the migration as well as decrease the 1205Lu invasiveness. The NLC 5-FU + siRNA Bcl-2, evaluated in vivo in a xenotransplant model of the A431, can suppress tumor growth with controlled inflammatory infiltration (low levels of myeloperoxidase, N-acetylglucosaminidase and TNF-α). Furthermore, NLC 5-FU + siRNA Bcl-2 presented effective tumor apoptosis, Bcl-2 knockdown and negativity for extracellular matrix remodeling.

Keywords: Nanostructured Lipid Carrier, Gene therapy, Bcl-2 siRNA, Gli-1 siRNA, EGFR siRNA, 5-fluorouracil, Skin cancer.

Lista de Figuras

Figura 2. Estrutura química do fármaco antitumoral 5-fluorouracil (5-FU)...... 40

Figura 4. Esquema no nanosistema lipídico - Carreador lipídico nanoestruturado (CLN) contendo 5-fluorouracil e pool de siRNAs - Bcl-2 + Gli-1 + EGFR......... 46

Figura 9: Estudos farmacotécnicos preliminares do CLN: (A) rastreamento de tempo de preparo das pré emulsões a 12000 e 20000 rpm, (B) Diâmetro de

Figura 23. Estudo de liberação do 5-FU a partir do CLN em todos os volumes de preparo, durante 8 horas em Célula de difusão de Franz (n=5)...... 106

Figura 26. Estudos cutâneos ex vivo realizados utilizando o modelo explante hOSEC onde a retenção do 5-FU proveniente do CLN foi avaliada em pele humana por 15 dias. (A) Retenção do 5-FU nas camadas da pele e sua relação

Figura 29. Estudo de viabilidade celular em cultura bidimensional (2D) da linhagem HaCaT, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, 117

Figura 30. Estudo de viabilidade celular em cultura bidimensional (2D) da linhagem A431, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, 118

Figura 31. Estudo de viabilidade celular em cultura bidimensional (2D) da linhagem A375, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, 119

Figura 33. Estudo de viabilidade celular em cultura bidimensional (2D) da linhagem 1205Lu, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, 121

Figura 39. Estudo de viabilidade celular em cultura tridimensional (3D) da linhagem A431, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, 132

Figura 40. Estudo de viabilidade celular em cultura tridimensional (3D) da linhagem A375, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, 133

Figura 42. Estudo de viabilidade celular em cultura tridimensional (3D) da linhagem 1205Lu, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, 135

Figura 48. Imagem representativa de Microscopia de Confocal do ensaio de uptake celular em 24 horas dos esferoides 3D gerados a partir das linhagens tumorais A431, A375, Sk-mel-103, 1205Lu. 20 ×, λ = 405 nm e λ = 638 adequados para DAPI e Alexa 647, respectivamente. A barra de escala indica 300 µm.

Figura 51. Determinação da via endocítica de internalização do CLN desenvolvido, sendo inicialmente avaliada a (A) viabilidade da linhagem A431 frente aos diferentes inibidores de modo a selecionar a concentração ideal para atuar na inibição da via, seguido da (B) determinação da internalização do CLN após inibição das vias utilizando os respectivos inibidores. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95 % de confiança, Tukey's test.

Figura 54. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: 5-FU nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN 5-FU nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's teste.

Figura 55. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: CLN siRNA Bcl-2 nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN siRNA Gli-1 nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu; e CLN siRNA EGFR nas linhagens (I) A431, (J) A375, (K) Sk-mel-103 e (L) 1205Lu.

Figura 58. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: CLN 5-FU + siRNA Bcl-2 + siRNA Gli-1 nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN 5-FU + siRNA Bcl-2 + siRNA EGFR nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu; e CLN 5-FU + siRNA Gli-1 + siRNA EGFR nas linhagens (I) A431, (J) A375, (K) Sk-mel-103 e (L) 1205Lu. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's teste.

Figura 61. Gráficos Mapas de calor referentes ao Ensaio de invasão celular em Transwell da linhagem de melanoma 1205Lu após aplicação dos tratamentos nas condições de (A) cultivo 2D em 24 horas e (B) 48 horas e (C) cultivo 3D em 24 horas e (D) 48 horas. Os dados tratam-se das células que migraram através do poro, atingindo o compartimento inferior. A normalização foi realizada de acordo com o Controle. As barras de cores ao lado indicam a capacidade das

Figura 65. Esquema das etapas do experimento in vivo, sendo que ao final todos os tumores, dos animais dos grupos experimentais, foram excisados e estudados em aspectos macroscópicos e histológicos, bem como análises de infiltrados inflamatórios, proteína Bcl-2, citocinas, apoptose, produção de tecido fibroso.

Figura 66. Avaliação da atividade antitumoral in vivo após 15 dias de tratamento tópico onde avaliou-se (A) o peso dos animais, (B) o volume tumoral bem como o (C) peso dos tumores após eutanásia dos animais, e a (D) análise do crescimento tumoral médio durante todo o tratamento. Análises estatística foram realizadas através de Two-way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's Test... 162

Figura 68. Análise histológica por HE do tecido cutâneo dos camundongos NU(Ico)-Foxn1^{nu} (A) Sadios, na qual não houve injeção das células A431, (B) Controle tumoral onde não foi realizado nenhum tratamento, e daqueles que

Lista de Tabelas

 Tabela 2. Intervalos e níveis dos fatores independentes investigados.
 52

Tabela 3. Concentrações dos inibidores utilizadas no ensaio de viabilidade demodo a selecionar a concentração ideal para uso no ensaio de determinação davia de internalização (n=4).66

Tabela 5. Tratamentos inseridos no compartimento do Transwell no ensaio deinvasão celular tanto em cultivo 2D como 3D da linhagem de melanoma 1205Lu.N.A - não se aplica, si - siRNA.69

Tabela 9. Dados da predição teórica e dados obtidos experimentalmente daotimização do CLN através do Design Composto Central.88

Tabela 11. Características apresentadas pelo CLN, contendo ou não 5-FU emtodos os volumes de preparo, após ser liofilizado e ressuspenso. Tukey's test,95% de confiança. As respectivas letras sobrescritas indicam igualdadeestatística.95

Tabela 12. Dados das análises térmicas dos componentes da formulação doCLN, as nanoestruturas e suas variações de volumes de preparo contendo e nãocontendo 5-FU por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial devarredura (DSC). ND= não determinado.100

Tabela 13. Dados das cinéticas de liberação para todos os volumes de preparo do CLN contendo 0,5% (m/m) de 5-FU. Os CLNs foram avaliados quanto às cinéticas de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson–Crowell (n=5)...107

Lista de Abreviaturas e siglas

- %DL Drug loading
- %EE eficiência de encapsulação
- 2D bidimensional
- 3D tridimensional
- 5-FU 5-Fluorouracil
- CA ceratose actínica
- CLAE cromatografia liquida de alta eficiência
- CLN carreador lipídico nanoestruturado
- CPNM câncer de pele não melanoma
- DCC design composto central
- DLS dynamic light scattering
- DMEM dulbecco's Modified Eagle Medium
- DNA ácido desoxirribonucleico
- DOTAP 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
- DSC differential scanning calorimetry
- dsRNA double stranded RNA
- EDTA ethylenediamine tetraacetic acid
- EGFR receptor do fator de crescimento epidérmico
- ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- FDA Food and drug administration
- FTIR fourier-transform infrared spectroscopy
- GLI oncogene do Glioma
- H2O2 peróxido de hidrogênio
- H2SO4 ácido sulfúrico
- Hh hedgehog
- iRNA RNA de interferência
- IncRNA long non-coding RNA
- MET microscopia eletrônica de Transmissão
- miRNA micro RNA
- MPO Mioeloperoxidase
- mRNA RNA mensageiro
- MβCD Metil beta ciclo dextrina

- N/P razão nitrogênio fosfato
- NaCl cloreto de sódio
- NAG n-acetilglucosamina

ncRNA non-coding RNA

- NLS nanopartícula lipídica sólida
- NTA nanoparticle traking analysis
- PBS Phosphate buffer
- PCP parâmetros críticos de processo
- piRNA piwi RNA
- RISC complexo de silenciamento induzido por RNA
- RNA Ácido ribonucleico
- rRNA RNA ribossomal
- RT radioterapia
- SBF soro bovino fetal
- shRNA short hairpin RNA
- siRNA small interfering RNA
- TGA Termogravimetric analysis
- TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
- TNF-α Fator de necrose tumoral alpha
- TTC 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride
- UV ultravioleta

Resum	0		i	
Abstrac	:t		ii	
Lista de	ə Fiç	guras	iii	
Lista de Tabelasxiii				
Lista de	e Ab	previaturas e siglas	xv	
Introdu	ção		25	
1.1.	Ter	apia gênica	26	
1.1	.1.	Conceitos e desafios	26	
1.1	.2.	Terapia de silenciamento gênico	27	
1.1	.3.	Terapias baseadas em siRNA - Pool de siRNAs	30	
1.2.	Vet	ores não virais – Sistemas Nanoestruturados	33	
1.3.	Câr	ncer de pele	35	
1.4.	Аp	ele - Via de administração tópica	40	
1.5.	Ter	apias multifuncionais	45	
Objetiv	os		47	
2.1. C)bje	tivo Geral	48	
2.2. C)bje	tivos específicos	48	
Materia	leN	Nétodos	49	
3.1.	Mat	terial	50	
3.2.	Qua	antificação do 5-FU por Cromatografia Líquida de Alta Efic	;iência	
(ULA)	⊑) ⊑at	udeo formeostácnicos proliminaros	50	
ა.ა. ა⊿		udos farmacotecnicos preiminares	01 Dian of	
S.4. Expe	rime	ents (DoE)	52	
3.5.	Est	udos iniciais de escalonamento – Scaling up	53	
3.6.	Car	acterização físico-química do CLN	53	
3.6	.1.	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	53	
3.6	.2.	Análise rastreamento de nanopartículas (NTA)	54	
3.6	.3.	Eficiência de encapsulação (%EE) e drug loading (%DL)	54	
3.6	.4.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	55	
3.6	.5.	Estudos de estabilidade e Liofilização do CLN	55	
3.6	.6.	Análises termogravimétricas (TGA)	56	
3.6	.7.	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	56	
3.6 (FT	.8. TR)	Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de 57	Fourier	

SUMÁRIO

3.7.	Со	mplexação e Estabilidade do complexo	57
3.8.	.8. Estudos de Liberação		
3.9.	Est	udos cutâneos	58
3.9	9.1.	Viabilidade tecidual - Cloreto de trifenil tetrazólio (TTC)	60
3.9	9.2.	Estudos <i>in vitro</i> de permeação e retenção cutânea em pele hu 60	mana
3.9	9.3.	Estudos <i>ex vivo</i> de permeação e retenção cutânea em pele hu 61	mana
3.10.	E	nsaios Celulares	62
3.1 du	0.1. plica	Determinação da cinética de crescimento celular e temp ção (<i>Doubling time</i>)	oo de 62
3.1	0.2.	Estudos de Viabilidade Celular em cultivo bidimensional (2D) 63
3.1 (3[0.3. D)	Desenvolvimento e padronização dos esferoides tridimens 64	ionais
3.1	0.4.	Estudos de Viabilidade Celular em cultivo tridimensional (30) 64
3.1	0.5.	Uptake celular em Microscopia Confocal	65
3.1	0.6.	Uptake celular em Citometria de fluxo	65
3.1	0.7.	Determinação da via endocítica de internalização	66
3.11.	Α	tividade antitumoral <i>in vitro</i>	67
3.1	1.1.	Estudos de migração celular (Scratch assay)	67
3.1	1.2.	Estudos de invasão celular	69
3.1	1.3.	Estudos de Proliferação Celular, Apoptose e Necrose	71
3.12.	Α	tividade antitumoral <i>in vivo</i>	71
3.1	2.1.	Delineamento do estudo – Indução e tratamentos	72
3.1	2.2.	Avaliação da Redução tumoral	73
3.1	2.3.	Determinação de mieloperoxidases (MPO)	73
3.1	2.4.	Determinação de N-acetilglucosamina (NAG)	74
3.1	2.5.	Estudos histológicos por Hematoxilina / Eosina (HE)	74
3.1	2.6.	Estudos histológicos por Tunel	75
3.1	2.7.	Estudos histológicos por Tricômico de Masson	76
3.1	2.8.	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA)	77
Result	ados	e Discussão	79
4.2.	Est	udos farmacotécnicos preliminares	81
4.5.	Car	acterização físico-química do CLN	92
4.6.	Со	mplexação e Estabilidade do complexo	101
4.7.	Est	udos de Liberação	104

4.8. Estudos cutâneos 108
4.9. Estudos celulares 115
4.9.1. Determinação da cinética de crescimento celular e tempo de duplicação (<i>Doubling time</i>)115
4.9.2. Estudos de Viabilidade Celular em cultivo bidimensional (2D) 116
4.9.3. Desenvolvimento e padronização dos esferoides tridimensionais(3D) 124
4.9.4. Estudos de Viabilidade Celular em cultivo tridimensional (3D) 130
4.9.5. Uptake celular em Microscopia Confocal e Citometria de Fluxo. 139
4.9.6. Determinação da via endocítica de internalização144
4.10. Atividade antitumoral <i>in vitro</i> 147
4.10.1. Estudos de migração celular (Scratch assay) 147
4.10.2. Estudos de invasão celular154
4.10.3. Estudos de Proliferação Celular, Apoptose e Necrose 158
4.11. Atividade antitumoral in vivo160
Conclusão174
Referências 176
ANEXOS 199

Introdução

1.1. Terapia gênica

1.1.1. Conceitos e desafios

Medicamentos baseados em terapia gênica são definidos como um medicamento biológico que cumpre as duas seguintes características: (i) contém uma substância ativa que contém ou consiste em um ácido nucleico recombinante usado ou administrado a seres humanos com o objetivo de regular, reparar, substituir, adicionar ou deletar uma sequência genética; (ii) é terapêutico, efeito profilático ou diagnóstico e relaciona-se diretamente com o sequência de ácido nucleico que contém, ou com o produto da expressão genética desta sequência (WIRTH; PARKER; YLÄ-HERTTUALA, 2013).

A terapia gênica é uma opção terapêutica estudada para diversas doenças e atualmente, de acordo com a aprovação do FDA, existem 21 produtos baseados em terapia celular ou gênica. Gendicine (Shenzhen SiBiono GeneTech Co.) foi o primeiro produto a entrar no mercado farmacêutico a adotar terapia gênica para uso clínico, aprovado pela China em 2003. Este produto consiste em um adenovírus recombinante projetado para expressar um p53 do tipo selvagem, indicado para tratar câncer de cabeça e pescoço. No entanto, após 12 anos na clínica, este produto ainda está aguardando a aprovação do FDA (ZHANG et al., 2018b). Após 9 anos do primeiro produto, o segundo produto, Glybera (uniQure Co.) foi aprovado na União Europeia e nos Estados Unidos. O Glybera foi baseado em um adenovírus como vetor, indicado para tratar a deficiência de lipoproteína lipase (LPLD), uma doença hereditária rara (JIM DALEY, 2019). Esse produto ficou conhecido como "droga de um milhão de dólares", que rendeu milhões de dólares, mas logo saiu do mercado em 2017 por inefetividade.

A realidade da terapia gênica na atualidade é que poucos produtos chegam ao mercado por diversos motivos: (i) demanda estudos moleculares exaustivos na compreensão dos efeitos terapêuticos bem como adversos, e exatamente por isso (ii) demanda maiores investimentos, (iii) demanda qualificação na produção, devido ao padrão de sensibilidade do produto final, (iv) enfrenta concepções ideológicas a respeito da sua ação e efeitos a longo prazo, e por toda a tecnologia envolvida (v) acaba alcançando uma parcela mínima da

população devido ao alto custo do produto final (DELHOVE et al., 2020; VAN OVERBEEKE et al., 2021; WIRTH; PARKER; YLÄ-HERTTUALA, 2013).

Entretanto nestes últimos dois anos o mundo enfrenta a maior provação necessária de que as terapias gênicas em geral são efetivas, e que embora o custo, ainda são a melhor alternativa para doenças e ou enfrentamentos de saúde pública. A realidade atual frente a uma situação de pandemia, após a disseminação do SARS-CoV-2, modifica o cenário e sugere um novo horizonte no que diz respeito ao uso de vetores em geral e à adoção da terapia gênica.

A emergência que o mundo vive na busca por uma opção terapêutica e / ou imunizante que seja capaz de conter e frear a pandemia tem colocado um desafio à pesquisa em todo o mundo. A rápida disponibilidade de vacinas foi possível devido ao trabalho de pesquisadores e empresas ao redor do mundo e não é por acaso que a maioria das vacinas desenvolvidas adota terapias gênicas ou o uso de vetores (ABU ABED, 2021; BERBER et al., 2021).

As vacinas Pfizer-BioNTech e Moderna COVID-19 adotam um mRNA, ambas instruem a célula a produzir a proteína "*Spike*" para estimular o sistema imunológico inato a produzir anticorpos; a vacina Janssen COVID-19 da Johnson & Johnson adota um adenovírus como vetor para uma porção da proteína SARS-CoV-2 'S; a vacina AstraZeneca por sua vez é baseada na ChAdOx1-S / nCoV-19, e também adota como vetor um adenovírus (Abu Abed, 2021; Berber et al., 2021; Kostarelos, 2020).

A terapia gênica e o uso de vetores têm enfrentado, junto com o mundo, um grande desafio, e após meses de vacinação, a queda no número de casos e internações, sugere que esse desafio tem sido superado. Não haverá outra situação em que exemplifique melhor a eficácia e segurança da terapia gênica, bem como o uso de vetores, do que a pandemia de SARS-CoV-2 (Abu Abed, 2021; Berber et al., 2021; Kostarelos, 2020).

1.1.2. Terapia de silenciamento gênico

O uso terapêutico de moléculas de RNA começou a ser estudado nas décadas de 1990 - 2000 (SULLENGER; GILBOA, 2002), quando os pesquisadores perceberam que o comportamento de diferentes tipos de RNA poderia ser favorável na clínica (HANNA; HOSSAIN; KOCERHA, 2019; ROSA et al., 2018; XIONG et al., 2018). O RNA, diferente do DNA, apresenta-se em

diversas formas estruturais que dependem do ambiente em que se encontram, podendo ser: RNA mensageiro (mRNA) responsável pela tradução de proteínas através de RNAs não codificantes (ncRNAs) como: microRNAs (miRNAs), RNA de transferência (tRNAs), *small interfering* RNAs (siRNAs), *short hairpin* RNAs (shRNAs), RNA ribossomal (rRNA), RNA de interação com Piwi (piRNAs) e RNAs não codificantes longos (lncRNAs). Os ncRNAs atuam na regulação gênica, transferindo informações do DNA para a proteína (produto final) (BENNETT; SWAYZE, 2010; CHERY, 2016; HANNA; HOSSAIN; KOCERHA, 2019). Basicamente, o uso de RNA poderia ocorrer nas seguintes formas: (i) inibidores de genes e proteínas, (ii) modificadores de genes e (ii) RNAs imunoestimuladores.

A descoberta do RNA como agente silenciador venceu o prêmio Nobel de medicina em 2006 (FIRE et al., 1998) onde os pesquisadores elucidaram que o mecanismo de RNAs de interferência (RNAi) se tratava de um processo celular natural, que nada mais é do que um mecanismo de defesa que regula a expressão gênica nas células. Os autores também mostraram que os processos de inibição eram desencadeados por siRNAs e shRNAs, variações de RNAi.

Em mecanismos celulares normais, o shRNA é sintetizado no núcleo e exportado para o citoplasma, onde é convertido em siRNA. Os siRNAs são processados a partir de *double-stranded* RNA (dsRNAs) exógenos por um membro da RNAse III denominado Dicer. Os dsRNAs possuem cadeias mais longas e são clivadas em sequências em torno de 20 a 24 nucleotídeos. Os siRNAs processados são carregados pelo Dicer e processados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Após a formação do complexo com RISC, os siRNAs exibem uma complementaridade ao seu mRNA alvo, com uma clivagem ocorrendo a partir da extremidade 5'. Então, essa complementaridade com o mRNA é realizada e o mRNA é clivado e impedido de ser traduzido na proteína / gene específico (Figura 1) (GUPTA et al., 2021; KARIM et al., 2018; ROSA et al., 2018).

Embora o primeiro uso de iRNA tenha sido por meio de um vetor viral, estudos indicam que o uso de vetores não virais é mais seguro para a prática clínica (CHERY, 2016; MOHAMMADINEJAD et al., 2020; NIIDOME; HUANG, 2002) e, atualmente, tecnologias baseadas em RNAi usam esse maquinário para mover siRNA / shRNA em células, transfectando-as através de vetores não virais

como poliplexos, lipoplexos e nanopartículas. Assim, por meio de vetores, os siRNAs / shRNAs são entregues na célula e seguem a via do RNAi (BORGHETI-CARDOSO et al., 2020; ROSA et al., 2018).



Figura 1. Mecanismo RNA de interferência através de siRNA exógeno ou dsRNAs, que através do DICER são carregados e processados pelo complexo RISC, o que culmina na clivagem do RNA mensageiro complementar; um segundo caminho possível é através do processamento nuclear, onde os siRNAs, shRNAs entram na via dos microRNAs e através de DICER atuam na inibição da tradução do RNA mensageiro que contém a sequência complementar.

siRNAs tem sido usados para tratar doenças que superexpressam moléculas, como proteínas, por exemplo. O uso de um siRNA irá silenciar temporariamente (durante a duração do tratamento) a produção dessas moléculas, que não estão necessariamente relacionadas a mutações genéticas, mas sim, com sua superexpressão, como no caso de várias proteínas superexpressas no câncer (BORGHETI-CARDOSO et al., 2020; LABALA et al., 2017; ROSA et al., 2018; VICENTINI et al., 2013).

1.1.3. Terapias baseadas em siRNA - Pool de siRNAs

O primeiro produto a ser lançado no mercado com a tecnologia do siRNA, ocorreu a pouco tempo atrás, em 2018, e o produto é chamado ONPATTRO[®] (Patisirana). Este produto farmacêutico consiste em uma solução intravenosa contendo siRNA específico para transtirretina (TTR), em sua forma mutante e normal. Essa proteína é produzida de forma anormal (mutante) e ela desencadeia uma doença conhecida como amiloidose hATTR. O medicamento foi formulado contendo nanopartículas lipídicas para distribuição deste siRNA aos hepatócitos, de modo a bloquear a tradução da proteína aberrante. A posologia recomendada é 0,3 mg/kg administrada por infusão intravenosa uma vez a cada 3 semanas para controle da doença (SAÚDE, 2020; SAW; SONG, 2020).

siRNA é uma macromolécula polianiônica grande (~13 kD) e não conseguiria atravessar a membrana celular sem ajuda, devido à eventos de repulsão de carga negativa das membranas celulares, sendo então necessário o uso de um vetor. O vetor que irá carrear o siRNA deve contornar todas as barreiras enfrentadas a depender da via de administração. Essas barreiras incluem resistência à enzimas em geral, filtração renal e captação pelo sistema mononuclear fagocitário, além de performar a entrega no citosol das células alvo (GUPTA et al., 2021; OZCAN et al., 2015; SAW; SONG, 2020).

Teoricamente, um siRNA poderia ser projetado para direcionar e silenciar virtualmente qualquer mRNA, no entanto, o principal obstáculo do uso clínico de siRNAs está no desenvolvimento de método de entrega de siRNA para célulasalvo. Assim como qualquer molécula ativa, o uso de siRNAs gera efeitos adversos, porém ainda pouco elucidados (ZHANG et al., 2018a).

Denominados efeitos "off-target" são os primeiros efeitos considerados efeitos adversos causados pelos siRNAs, onde há um silenciamento não intencional de alvos desconhecidos. Existem dois mecanismos sugeridos para explicar este efeitos "off-target", sendo eles: (i) incompatibilidades em relação aos alvos, gerando problemas na complementaridade, desta forma o siRNA não é capaz de inibir eficientemente o alvo e se torna um siRNA circulante; (ii) entrada de siRNAs em vias de miRNA endógenos. Devido aos siRNAs serem quase identicos à classe relacionadas de miRNAs, eles podem reconhecer

mRNAs e levam à degradação de um número imprevisível de mRNAs não alvos (OZCAN et al., 2015).

A discussão a respeito dos efeitos *"off-target"* se estende ao longo da última década, porém ainda existem discussões suficientes sobre o que pode ser feito para evitá-los. No entanto já se discute sobre a relação concentração *versus* efeitos.

Uma estratégia discutida para evitar ou reduzir esses efeitos se baseia na utilização de concentrações baixas de siRNA, porém quando a concentração é reduzida, em muitos casos, o número de doses teria que aumentar. Em determinados tipos de alvos, essa estratégia não é efeitva, por isso a utilização de *pools* de siRNAs vem sido praticada. O intuito do *pool* de siRNA é utilizar pelo menos três siRNAs que agirão em caminhos moleculares distintos, porém culminando juntos, em um objetivo comum. Desta forma, utiliza-se menores concentrações de cada, não gerando então efeitos *off target*, porém sem perder a ação (HANNUS et al., 2014).

Ainda existem poucos trabalhos reportados na literatura adotando essa estratégia, mas pode-se mencionar a combinação do fármaco 5-FU com os siRNAs Bcl-2, Bcl-xl e Mcl-1 em dendrímeros. Os autores reportaram o sucesso nos multi-alvos e alta efetividade do sistema utilizando baixas concentrações dos siRNAs (~8,3 nM de cada siRNA) (DZMITRUK et al., 2015; IHNATSYEU-KACHAN et al., 2017; IONOV et al., 2015). Trabalhos e Patentes tem sido publicadas com propostas de *pools* de siRNAs para diversas doenças, sendo elas, condições inflamatórias de feridas, câncer de mama, glioblastoma (EVANS; POTOMAC; XU, 2015; KOZIELSKI et al., 2019; LU; LING LI; SIMONENKO, 2018).

No presente trabalho adotou-se essa combinação de siRNAs, em *pool*, visando atingir e reduzir o desenvolvimento do câncer de pele com alvos simultâneos, sendo eles siRNA Gli-1, tendo como alvo os processos de regulação gênica e proliferação, siRNA EGFR, tendo como alvo os processos de proliferação, diferenciação e invasão, e siRNA Bcl-2, tendo como alvo à apoptose.

As vias moleculares que estão envolvidas no desenvolvimento do câncer de pele vem sendo cada vez mais estudadas. Atualmente, aponta-se a via *Hedgehog* (Hh) como uma das principais vias de sinalização e crescimento do câncer de pele não melanoma. A via Hh em mamíferos está associada às sinalizações de proliferação, crescimento e controle de destino celular em muitos tecidos. A superativação da via Hh tem sido relacionada a tumorigênese de vários tipos tumores humanos (CASAS et al., 2017; MONTAGNA; LOPES, 2017; OLESEN et al., 2017).

Componentes centrais da via Hh consistem em três ligantes secretados (Sonic HH, Indian HH e Desert HH), um receptor de regulação negativa (PTCH), um receptor regulador positivo (SMO), associado aos fatores de transcrição do oncogene de glioma (Gli-1, Gli-2 e Gli-3). Na ausência do agente de ligação de Hh, o PTCH suprime a atividade de SMO, impedindo que o tráfico continue. Fatores de transcrição GLI são sequestrados no citoplasma por várias proteínas mediadoras, incluindo a proteína quinase A (PKA). GLI sofre uma clivagem específica e o produto resultante move-se para o núcleo e inibe a tradução dos genes alvo de Hh. Depois de ocorrer a ligação ao receptor, o PTCH é deslocado, permitindo, assim, a ativação do SMO. Quando ativado, GLIs são os efetores finais do caminho e, quando translocados para o núcleo, induzem a expressão de vários genes específicos que regulam a diferenciação celular, proliferação e sobrevivência. Quando ocorrem mutações no gene PTCH1, seu efeito inibitório em SMO se perde, então o fator GLI-1, que induz a transcrição de vários oncogenes, fica superativo, e o resultado desta cascata no tecido cutâneo é o desenvolvimento de câncer de pele não melanoma (MONTAGNA; LOPES, 2017; SPALLONE; BOTTI; COSTANZO, 2011).

A via Hh-GLI está envolvida no desenvolvimento não só do cancer de pele não melanoma, mas também de melanomas, uma vez que seu bloqueio inibiu também o desenvolvimento de crescimento celular em linhagens de melanoma humano (SANTINI et al., 2012).

Uma segunda via de crescimento e proliferação celular nos tipos de cancer de pele é a via receptor EGFR (*Epidermal Growth Factor receptor*). Esta via é tão importante para o desenvolvimento dos cânceres não melanoma quanto melanomas. A associação deste receptor com melanoma ainda é muito discutida, mas existem estudos que já trazem indícios importantes desta relação. A super expressão de EGFR está associada a diferenciação celular, podendo ter relação com tumorigênese. A inibição de EGFR para o tratamento de diversos tipos de câncer já vem sendo feita por anticorpos como Cetuximab e outros

(GROSS et al., 2014; ONO; KUWANO, 2006; SPALLONE; BOTTI; COSTANZO, 2011).

Em muitos tumores, incluindo os cutâneos, o processo de morte também é uma importante via. A morte celular normalmente, em tumores, encontra- se desregulada, e este fato pode ter como consequência uma resistência aos tratamentos disponíveis. O processo de apoptose ocorre em todas as células e tecidos, e é este processo que impede que células com problemas de replicações e/ou mutações continuem se proliferando. Quando este processo está suprimido, há o surgimento de tumores. A família das proteínas BCL está envolvida nos processos da cascata apoptótica. A Bcl-2 é uma das proteínas da família BCL que possui uma atividade anti-apoptótica. Esta proteína foi encontrada super-expressa em diversos tumores e é considerada a chave para o contínuo desenvolvimento dos tumores, tendo a via das caspases inibida (SERASINGH et al., 2015; VOGLER, 2014).

1.2. Vetores não virais – Sistemas Nanoestruturados

O uso de vetores para transportar ácidos nucleicos é difundido principalmente visando melhorar a estabilidade e facilitar o armazenamento, bem como visando proteção a eventos de degradação. Tanto DNAs como RNAs, em suas formas livres, ficam sujeitos a degradação e até mesmo têm sua expressão reduzida (HIDAI; KITANO, 2018; ITZIAR; RODR; VICENTE-PASCUAL, 2020; YADAV; GOPISANKAR, 2019).

Os tipos de vetores utilizados para carrear os ácidos nucleicos são os vetores virais e não virais, sendo os virais mais comumente utilizados: retrovírus, vírus herpes simplex, lentivírus, adenovírus e vírus adeno-associado; os não virais por sua vez podem se basear em organizações proteicas, peptídeos, polissacarídeos, e sistemas nanoestruturados orgânicos e inorgânicos (MANSOURI et al., 2004; YADAV; GOPISANKAR, 2019). Em geral, os sistemas nanoestruturados mais estudadas são baseadas em lipídios, polímeros e nanopartículas inorgânicas (ROSA et al., 2018).

No contexto da administração tópica, diretamente em lesões cutâneas, dentre as nanopartículas atualmente em investigação, os nanosistemas lipídicos predominam. As nanopartículas lipídicas em geral apresentam vantagens óbvias tal como o alto grau de biocompatibilidade, biodegradabilidade e versatilidade. A segurança comprovada e a eficácia dos nanocarreadores lipídicos os tornam candidatos atraentes para a formulação de produtos farmacêuticos (SALA et al., 2018).

O uso de nanopartículas à base de lipídios confirmaram sua capacidade de entregar ácidos nucléicos e agentes terapêuticos em geral de diferentes propriedades físico-químicas através da pele para uso local e sistêmico (MISHRA et al., 2018). Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidas na década de 1990 como uma alternativa às nanopartículas tradicionais, os lipossomas. São compostas por lipídios sólidos a temperatura ambiente e surfactantes como um emulsificante (LÓPEZ-GARCÍA; GANEM-RONDERO, 2015; RADAIC; DE PAULA; DE JESUS, 2015; SHASTRI, 2018).

NLS são consideradas mais seguros do que sistemas poliméricos devido ao seu processo de produção que normalmente dispensa o uso de solvente orgânico. Além disso, vale ressaltar que a produção de NLS se trata de um processo de baixo custo, passível de escalonamento. Além disso, os NLS podem incorporar moléculas tanto hidrofílicas e lipofílicas, e apresentam menor toxicidade devido ao uso de componentes biocompatíveis e degradáveis, possuem excelente estabilidade física e bom perfil de liberação. No quesito entrega de ácidos nucleicos, este ocorre encapsulado ou até mesmo, através do uso de lipídios catiônicos, pode-se realizar complexação dessas moléculas. No entanto, existem desvantagens nas NLS tais como baixas encapsulações, ocorrência de coalescência, o risco de gelificação e desencapsulação das moléculas causado por polimorfismo lipídico durante o armazenamento que precisavam ser superadas (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017; NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015; RADAIC; DE PAULA; DE JESUS, 2015)

Para superar as limitações das NLS, os Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram introduzidos. Estes diferem em sua estrutura, pela adição de lipídios líquido, em temperatura ambiente. A incorporação deste lipídio reduz os aspectos de organização do lipídio sólido e aumenta a performance no que diz respeito a liberação e encapsulação de agentes ativos. Quanto ao encapsulamento ou complexação de ácidos nucleicos, este é realizado da mesma forma que as NLS, através do uso de agentes catiônicos, que por interação iônica será capaz e aprisionar os ácidos nucleicos (EH SUK et al., 2020; EMAMI et al., 2017; MANAGULI et al., 2019; SATO et al., 2018).

Vários estudos demonstraram o uso de nanopartículas lipídicas para entrega de ácidos nucléicos em geral, e os resultados sugerem sucesso principalmente no que diz respeito a baixa toxicidade, alta transfecção e efetividade (DURYMANOV; REINEKE, 2018; RADAIC; DE PAULA; DE JESUS, 2015; VICENTINI et al., 2013; VIEGAS et al., 2020; YADAV; GOPISANKAR, 2019).

1.3. Câncer de pele

O câncer de pele é classificado em câncer de pele melanoma e câncer de pele não melanoma (CPNM). O CPNM é a neoplasia mais prevalente em todo o mundo, mas sua participação em estudos estatísticos é dificultada por um elevado número de casos não relatados (BORGHETI-CARDOSO et al., 2020; ESTEVA et al., 2017; WANG et al., 2020b).

O melanoma tem origem nos melanócitos, células responsáveis pela produção da melanina, pigmento responsável pela cor da pele e proteção contra os raios solares. Nesse processo patológico, várias mutações podem ocorrer, e inicialmente localiza-se na camada basal da epiderme (JENKINS; FISHER, 2020; KRATTINGER et al., 2018; LIU et al., 2018). Este tipo de câncer de pele é responsável por cerca de apenas 1% dos casos de câncer de pele, porém, é o câncer de pele com o maior percentual de óbitos e está entre os tipos de cânceres mais agressivos e de alto potencial metastático (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021; BRAY et al., 2018; FACTS, 2019).

A incidência de melanoma é maior na Austrália, seguida pela América do Norte e norte da Europa, e pode ser explicada pela etnia, onde os caucasianos são mais propensos a desenvolver melanoma do que a população negra e latina. A mortalidade é alta em ambos os sexos, mas a incidência é maior no sexo feminino (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Vários fatores de risco estão associados ao desenvolvimento de melanoma, mas o principal é a exposição excessiva à luz ultravioleta (UV). Esta exposição pode desencadear mutações nos melanócitos, e estes adquirem características invasivas e metastáticas (ZHANG et al., 2016).

A evolução do melanoma dá-se em 5 estágios, inicialmente limitados à epiderme sem a capacidade de invadir a derme (Estágio I). A evolução das lesões resulta no processo de invasão, invadindo parcialmente a derme (Estágio
II), estendendo-se pela derme (Estágio III) até atingir a derme profunda (Estágio
IV) e finalmente atingir o tecido subcutâneo (Estágio V) (KRATTINGER et al.,
2018; LIU et al., 2018).

A velocidade de evolução do melanoma associa-se a mutações que este câncer está propenso a desenvolver. As principais mutações observadas nos melanomas são aquelas envolvidas com a via BRAF / NRAS / MEK / MAPK, principalmente porque essas vias de sinalização já operam de forma aberrante mesmo sem mutações neste tipo de câncer de pele. Assim, essas vias são alvos recorrentes de terapias destinadas ao tratamento do melanoma. Infelizmente, as terapias atuais infundem quadros de resistência a múltiplas drogas (RMD), que requerem tratamentos cada vez mais inovadores que atuam simultaneamente nas vias do melanoma de forma mais agressiva (FEOKTISTOVA; PANAYOTOVA-DIMITROVA, 2017; ZHANG et al., 2016).

O prognóstico do paciente com melanoma é melhor quando há diagnóstico precoce. Para a realização do diagnóstico de melanoma, o exame clínico é feito por meio da observação da lesão cutânea, seguida de biópsia e identificação de marcadores de melanoma. Os biomarcadores são comumente usados para diagnóstico e prognóstico, possibilitando a identificação do estágio do câncer, bem como a ocorrência ou potencial de metástase. Além disso, um biomarcador pode indicar os quadros de suscetibilidade ou resistência do paciente ao tratamento. Para melanoma, ainda não existe um biomarcador ideal, portanto, um conjunto de moléculas como proteínas e enzimas (tirosinase, LDH, VEGF, metaloproteinases, COX-2), moléculas de fluido extracelular, metabólitos de melanina (5-S-cisteinil-DOPA, L -DOPA / L-tirosina) e ácidos nucléicos livres liberados pelos processos de necrose são usados para determinar este tipo de câncer de pele (KARAGIANNIS; FITTALL; KARAGIANNIS, 2015; KAUFFMANN; CHEN, 2014).

No entanto, é fato que os tratamentos escolhidos para melanoma vão depender do estágio da doença, incluindo terapias convencionais como excisões cirúrgicas e radioterapia (RT) e, tratamentos inovadores como terapia-alvo, imunoterapias e combinações de sistêmicas, terapias tópicas e transdérmicas.

Quando ainda não há capacidade metastática, o melanoma pode apresentar uma taxa de cura de até 90%, em contraste com a sobrevida do paciente com metástase, que cai para apenas cerca de 10%. Infelizmente, a detecção precoce é dificultada pela ausência de sintomas devido a informações inadequadas à população, além da apresentação das lesões iniciais serem altamente confundidas com lesões benignas (ESTEVA et al., 2017; KRATTINGER et al., 2018; LIU et al., 2018).

A opção cirúrgica é indicada para lesões com bordas bem definidas, mas riscos envolvidos com linfonodos acompanham esta opção, além do aumento das chances de a própria intervenção causar metástases e aumentar a chance de recidivas, devido ao desprendimento de células tumorais do tumor satélite. As cirurgias também são indicadas para remoções de tumores metastáticos em outros órgãos, em estágios avançados da doença (LENS et al., 2003).

No entanto, o tratamento primário para pacientes com bom prognóstico e lesões bem definidas é a radioterapia (RT). A RT tem taxas de redução tumorais satisfatórias, além de ser segura e bem tolerada (HEDBLAD; MALLBRIS, 2012). Além disso, a RT pode ser aplicada no tratamento de estágios mais avançados quando associada a outras modalidades terapêuticas, como a imunoterapia (NARAYANA et al., 2013).

O tratamento tópico por sua vez, apresenta-se como uma opção versátil para o melanoma cutâneo. É um tratamento menos invasivo e localizado, sendo indicado principalmente para lesões pré-neoplásicas e pequenas e também, para garantir as margens clínicas após a cirurgia. Os produtos tópicos também são indicados em combinação com quimioterapia ou imunoterapia por via oral / parenteral. A possibilidade de um tratamento localizado, que os tratamentos tópicos apresentam, tornam esta opção a melhor escolha quando as lesões comprometem áreas maiores ou estão localizadas na face ou em locais que o procedimento cirúrgico não é indicado pela possibilidade de causar deformação. (DORRANI et al., 2016; FLORIN et al., 2012; RAHIM; WUI, 2018; RUAN et al., 2016). Além disso, visto que o melanoma surge de melanócitos epidérmicos e, nos estágios iniciais, a principal camada afetada é a epiderme, o tratamento tópico mostra-se vantajoso (JOSE et al., 2017; SHAIN; BASTIAN, 2016; SINI et al., 2018).

Devido ao fato de os mecanismos moleculares do melanoma não estarem totalmente elucidados, a escolha das terapias sempre é dificultada e deve ser feita caso a caso. Para superar esses desafios, terapias inovadoras são necessárias, principalmente usando nanotecnologia baseada em sistemas de liberação.

O CPNM, por sua vez, tem suas vias de desenvolvimento molecular melhor elucidadas do que o melanoma, devido ao desenvolvimento se dar de forma mais linear, lenta e sem predominância de eventos mutagênicos. Dessa forma, as plataformas terapêuticas são mais eficientes do que para o melanoma. Além disso, a menor agressividade e o menor potencial invasivo contribuem para que o CPNM tenha melhor prognóstico e taxas de sobrevivência do que o melanoma (DIDONA et al., 2018).

O CPNM pode ser subdividido majoritariamente em carcinoma epidermóide / escamoso e carcinoma basocelular. Estatísticas mostraram (APALLA et al., 2017; FACTS, 2019; KAUVAR et al., 2015) um crescimento exponencial dos casos destes tipos de câncer especialmente em países de população majoritariamente caucasiana. Na Nova Zelândia, o CPNM tem alta incidência e os casos afetam mais homens do que mulheres (PONDICHERRY et al., 2018). Resultados opostos foram mostrados por um estudo de longo prazo na Coréia do Sul, onde a incidência em mulheres foi maior do que em homens (OH et al., 2018).

O aumento da incidência de câncer de pele também está relacionado ao envelhecimento (PONDICHERRY et al., 2018). Na Coreia do Sul, estudos mostraram que a faixa etária com maior incidência tanto de melanoma quanto de CPNM foi de 60-79 anos (OH et al., 2018).

O CPNM possui inúmeros fatores de risco que somados à genética podem aumentar a predisposição do indivíduo para desenvolver esse tipo de neoplasia. Os principais fatores, além da genética, são idade, exposição aos raios UV, radiação ionizante, imunossupressão, gonodermatoses, HPV, medicamentos como inibidores de TNF-α, uso de tabaco, infecções graves de pele e ossos e inflamações (CAMERON et al., 2019; DIDONA et al., 2018; GREEN; OLSEN, 2017; KABIR; SCHMULTS; RUIZ, 2018; KALLINI; HAMED; KHACHEMOUNE, 2015; KAUVAR et al., 2015).

Tanto o tipo escamoso como o basocelular, são originados nos queratinócitos e são conhecidos como carcinomas de queratinócitos. O basocelular é mais prevalente do que o escamoso, sendo responsável por cerca de 70% dos casos em oposição a 25% para o escamoso. Ambos os tipos

contribuem pouco para os casos de morte por câncer de pele, mas são considerados um importante problema de saúde pública, devido à sua alta incidência, sendo mais prevalentes do que todos os outros tipos de câncer juntos no mundo e também pelo ônus que representam (CAMERON et al., 2019; MOFIDI et al., 2018). O aumento exponencial do câncer de pele causa impactos psicossociais substanciais, sendo considerado um problema de saúde pública, que requer alto investimento em tratamentos inovadores bem como tecnologias de diagnóstico (MARKHAM et al., 2018; MOFIDI et al., 2018).

O tipo basocelular é comumente encontrado em cabeça e pescoço na forma de pápulas, com bordas bem definidas, e microscopicamente se apresenta como um tumor bem circunscrito. Eles são facilmente confundidos com lesões cutâneas benignas. Além disso, lesões de câncer de pele basocelular raramente ocorrerão nas formas ulcerativa e infiltrativa (CAMERON et al., 2019; ESTEVA et al., 2017).

O tipo escamoso por sua vez, tem apresentações de pele variáveis, que dependem do subtipo e localização. Geralmente se inicia em lesões précancerosas na qual a ceratose actínica (CA) é mais conhecida. CA e outras lesões pré-malignas podem progredir para câncer de pele não melanoma do tipo escamoso infiltrativo. O câncer escamoso possui várias denominações quando *in situ*, como doença de Bowen, caracterizada por placas escamosas com bordas bem definidas de feições eritematosas; Eritroplasia de Queyrat, caracterizada como aspecto peniano aveludado. Lesões *in situ* geralmente são assintomáticas e podem ser facilmente confundidas com outras manifestações cutâneas (APALLA et al., 2016; ESTEVA et al., 2017; KALLINI; HAMED; KHACHEMOUNE, 2015).

No que diz respeito ao tratamento, procedimentos cirúrgicos são uma opção para o tratamento do CPNM, mas dependendo da extensão das lesões ou da localização, opções alternativas não cirúrgicas são altamente recomendados, principalmente quando há lesões com margens bem definidas e apresentando áreas pequenas. Os principais tratamentos não cirúrgicos são curetagem, eletrodissecação, radioterapia, criocirurgia, medicamentos tópicos e terapia fotodinâmica (TFD). O tratamento de escolha varia de acordo com a área da lesão, localização e via molecular, porém, por se tratar na maioria dos casos, de lesões em regiões como face e pescoço, a opção de tratamento tópico

sempre está incluso, como principal escolha ou adjuvante (APALLA et al., 2017; GREEN; OLSEN, 2017; KAUVAR et al., 2015).

O 5-fluorouracil (5-FU) é um fármaco antitumoral indicado como padrão ouro para o tratamento de câncer de colo retal, porém nas últimas décadas, tem sido amplamente investigado no tratamento de outras neoplasias, incluindo câncer de pele. O 5-FU se trata de um fármaco antimetabólico, atuando como análogo de timina, e quando incorporado erroneamente, consegue impedir que a célula continue seu processo de replicação (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).



Figura 2. Estrutura química do fármaco antitumoral 5-fluorouracil (5-FU).

Inúmeros efeitos adversos locais e sistêmicos são observados para este fármaco, entre os efeitos adversos locais estão erupções cutâneas moderadas a graves, inflamação local, prurido, eritema, e efeitos sistêmicos como perda de peso, letargia, entre outros (CHUGHTAI et al., 2017; KISHI; PRICE, 2018). Desta forma, o 5-FU é um importante candidato a ser encapsulado em sistemas de liberação, de modo a se garantir seu efeito terapêutico, minimizando seus efeitos adversos.

1.4. A pele - Via de administração tópica

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando cerca de 10% da massa corporal e quase 2 m² da área de superfície corporal. É a pele a responsável pela fronteira do nosso organismo com o meio externo e desempenha funções corporais vitais tais como controle de perda de água, regulação da temperatura, proteção a choques mecânicos e barreira a patógenos. Todas essas funções acontecem para que a homeostase do nosso organismo de mantenha e então nosso corpo tenha um ambiente fisiológico controlado (BENÍTEZ; MONTÁNS, 2017; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2021).

Para desempenhar todas essas funções que lhe cabe, a pele é altamente seletiva quanto ao que deixa entrar ou sair do nosso organismo, e este papel de

barreira seletiva representa um dos maiores desafios para a entrega de moléculas através da pele (ROBERTS et al., 2017).

A pele é composta por um epitélio estratificado (Figura 4), onde cada camada consiste em diferentes tipos de células que desempenham funções distintas. As principais camadas são de fora para dentro (i) epiderme, (ii) derme e (iii) tecido subcutâneo ou hipoderme. A Epiderme por sua vez se subdivide nos estratos, onde a especialização das células é de extrema importância na seleção do que entra e sai através da pele. De fora para dentro tem-se o estrato córneo (*stratum corneum* - camada córnea); estrato lucidum (*stratum lucidum* - camada transparente), observado apenas em algumas regiões do corpo; estrato granuloso (*Stratum granulosum* - granular camada); estrato espinhoso (*Stratum spinosum* - camada de células espinhosas) e estrato basal (camada basal também chamada de *Stratum germinativum*). O estrato basal e estrato espinhoso são coletivamente conhecidos como Camada Malpighiana. Atravessando essas camadas tem-se os apêndices cutâneos sendo eles as glândulas sebáceas, sudoríparas, e folículos pilosos (BAROLI, 2010; GRAHAM et al., 2019).

A epiderme é a camada mais importante quando se trata da permeação de agentes ativos em geral através da pele, desta forma a compreensão de cada estrato auxilia na compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo.

O estrato córneo (*stratum corneum*), a camada mais externa de a pele, apresenta-se, majoritariamente no corpo, com espessura entre 10 a 20 µm sendo composta por 10 a 15 camadas de corneócitos. Os corneócitos são as células especializadas desse estrato, derivam de queratinócitos, porém mais achatados e alongados. Recebem essa nomenclatura pois possuem um envelope córneo no lugar da membrana plasmática, o que lhes confere papel altamente hidrofóbico. São células preenchidas com filamentos de queratina e se intercalam em uma matriz extracelular enriquecida com lipídios. Essa organização deu origem a referência de organização em "tijolo e argamassa", onde os corneócitos seriam os tijolos e a argamassa seria a matriz lipídica e a conexão desses corneócitos é realizada por corneodesmossomos. Um importante aspecto a ser ressaltado é que os corneócitos são continuamente descamados na superfície da pele. Exatamente por essa descamação, por não conter núcleo, o estrato córneo é conhecido como a camada não viável da

epiderme, e os demais estratos compõe a epiderme viável (BAROLI, 2010; CHAMBERS; VUKMANOVIC-STEJIC, 2020; OSSEIRAN et al., 2018; ROSA et al., 2018).



Figura 3. Desenho esquemático da pele evidenciando as camadas que a compões tais como epiderme e seus estratos, derme e tecido subcutâneo (Adaptado de (LEMOS et al., 2018). Imagens histológicas de autoria própria evidenciando as camadas da pele bem como os apêndices cutâneos. EC. Estrato córneo.

A epiderme viável apresenta tipicamente de 50 a 100 µm de espessura e essa camada não contém capilares sanguíneos nem terminações nervosas. Os estratos que a compõe são 95% queratinócitos, e os outros 5% divididos entre Células de Langerhans, melanócitos e Merkel. O estrato basal (*stratum basal*), que se localiza sobre a lâmina basal, camada que divide a epiderme da derme, é responsável pela geração de queratinócitos, e estes sofrem diferenciações

progressivas, na medida que migram para o exterior, em direção ao estrato córneo. A diferenciação destes queratinócitos é caracterizada pelo aumento da queratinização, formação dos corpos lamelares que secretam lipídios e a perda de organelas intracelulares e núcleos, tornando-se corneócitos (DĄBROWSKA; ROSSI, 2018; GRAHAM et al., 2019).

Acima do estrato basal tem-se o estrato espinhoso (*Stratum Spinosum*) e a nomenclatura deriva do fato que esse estrato deriva de queratinócitos maduros contendo proteínas aderidas às células, que se assemelham a espinhos. Esses espinhos são desmossomos que unem célula a célula através do citoesqueleto. Logo acima deste estrato tem-se os estratos granuloso (*stratum granulosum*) e lúcido (*stratum lucidum*), com 2 a 3 camadas de células cada. Estes estratos contêm queratinócitos maduros que secretam corpos lamelares de lipídios e proteínas para o espaço extracelular. Estes corpos lamelares vão conferindo um envelope lipídico hidrofóbico que representa a barreira mecânica da pele assim como barreira à penetração de patógenos. O nome *granulosum* por sua vez, é devido a grânulos de querato-hialina nas células, preenchido de lipídios e proteínas de fillagrina (BAROLI, 2010; RUŽICA JURAKIĆ TONČIĆ 2018.PDF, [s.d.]).

À medida que os queratinócitos migram para a superfície, os queratinócitos morrem, secam, perdem seus núcleos, ganham formato hexagonal, e então são denominados corneócitos. Todo este ciclo de vida dos queratinócitos até se tornarem corneócitos dura entre 28 e 50 dias, dependendo da idade e da localização (BENÍTEZ; MONTÁNS, 2017).

A derme por sua vez, camada de normalmente ≥1 mm de espessura, é a camada predominante da pele, e desempenha funções de elasticidade, nutrição e força. É composta principalmente de fibroblastos relacionados em uma matriz extracelular de proteínas estruturais, principalmente colágeno e elastina. A derme contém células imunes circulantes sendo elas majoritariamente, macrófagos e células dendríticas dérmicas. Assim como a epiderme, a derme pode ser subdividida em derme papilar e a derme reticular, sendo a derme papilar aquela em contato com a camada basal da epiderme e a derme reticular localizada internamente (BAROLI, 2010; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2021). A derme papilar contém papilas que em contato com a camada basal formam a junção dermoepidérmica, importante na manutenção estrutural de toda a

arquitetura da pele. A derme contém folículos pilosos, glândulas, terminações nervosas sensoriais, vasos linfáticos e capilares sanguíneos (IQBAL; ALI; BABOOTA, 2018).

A hipoderme é a camada mais interna da pele, por isso conhecida muitas vezes como tecido subcutâneo. Essa camada é composta principalmente por adipócitos e entre eles vasos linfáticos maiores e vasos sanguíneos (BAROLI, 2010; ROSA et al., 2018).

Tendo em vista toda a complexidade da arquitetura cutânea, o desafio de permear toda essa organização é inevitável, e desafios farmacotécnicos, para conseguir superar as barreiras impostas pelo tecido cutâneo, são levados em conta quando se pretende atuar através da pele.

Existem três rotas principais conhecidas para permeação de moléculas através da pele, são elas (i) a via intracelular, onde as moléculas ou estruturas conseguem atravessar as membranas das células; (ii) a via extracelular, onde as moléculas ou estruturas são capazes de atravessar via matriz extracelular e a última via, considerada caminho preferencial facilitado, que é (iii) a via dos apêndices, onde há um depósito das moléculas ou estruturas nos apêndices cutâneos. Cada via apresenta desafios importantes a serem pontuados visto que para atravessar as células é necessário conseguir atravessar a membrana celular, particionar pela matriz extracelular é necessária alta lipofilia e por fim, a rota via apêndices é limitada a pequenas concentrações, devido a limitação da área, além de estar sujeita a saturação rápida. Desta forma, esforços farmacotécnicos são realizados o tempo todo para superar as barreiras e permear efetivamente pela pele (CHAULAGAIN et al., 2018; SHIGEFUJI; TOKUDOME, 2020; ZHENG et al., 2020).

Ainda diante todos os desafios de permeação no tecido cutâneo, a utilização da pele como via de administração é muito vantajosa no que diz respeito a doenças cutâneas, por se tratar de uma terapia localizada e também quando há intenção de alcançar a circulação sistêmica contornando problemas relacionados a outras vias de administração.

A administração tópica de produtos e fármacos pode ser utilizada em dois cenários, onde há como objetivo ação local, ou seja, no próprio tecido, ou quando há intuito de ação sistêmica, ou seja, objetiva-se uma ação transdérmica, onde o produto ou fármaco irá alcançar vasos sanguíneos através da sua penetração

até a derme. Ambos os casos, ação tópica ou transdérmica, a primeira barreira é o estrato córneo, por este motivo, o uso de formulações de composição semelhante a essa camada são desejáveis, de modo a ofertar ao tecido moléculas que sejam compatíveis e consigam interagir, solubilizar ou se acumular, de modo a liberar o agente ativo efetivamente (CHAULAGAIN et al., 2018; IQBAL; ALI; BABOOTA, 2018; PAN et al., 2018; ROSA et al., 2018; SALA et al., 2018; TIWARI et al., 2012).

1.5. Terapias multifuncionais

Diante da dificuldade de se selecionar uma única opção terapêutica efetiva para o tratamento de câncer de pele, e também outros tipos de câncer, o uso de terapias com múltiplos à alvos, chamadas terapias multifuncionais, tem sido amplamente adotadas. As terapias multifuncionais tornam-se opções promissoras devido à alta complexidade dos inúmeros processos moleculares que estão ocorrendo ao mesmo tempo de forma desregulada nas lesões cancerosas (LI et al., 2018).

Terapias multifuncionais como o próprio nome já diz, são terapias baseadas múltiplas funções, podendo estas serem: funcionalizações, múltiplos fármacos ou moléculas ativas, combinações de tratamento e diagnóstico – teranóstico, funcionalizações combinadas a agentes terapêuticos, múltiplos ácidos nucleicos, combinações de fármacos com ácidos nucleicos, terapias térmicas carreando fármacos, entre outras combinações (ANG et al., 2021; CHO et al., 2008; FERREIRA; NÓVOA; MARQUES, 2016; TORCHILIN, 2014).

Deste modo, objetivando múltiplos caminhos, as terapias multifuncionais trazem uma abordagem agressiva no enfrentamento de diversos cenários onde o microambiente tumoral dificulta um tratamento *single*, tais como: resistência a fármacos, incidência de metástases, invasões e migrações de tumores, ocorrência de mutações (BADEA, 2017; BORGHETI-CARDOSO et al., 2020; LI et al., 2018).

No presente trabalho utilizou-se uma terapia multifuncional baseada no uso de um nanosistema lipídico contendo uma combinação de um fármaco antimetabólico, 5-Fluororuracil (5-FU), e *pool* de siRNAs, sendo eles siRNA Gli-1, siRNA EGFR e siRNA Bcl-2 (Figura 4), de modo a atuar em diferentes vias do câncer de pele, e que todos os siRNAs se correlacionem de algum modo, com o aumento da efetividade do 5-FU. Desta forma, combinando um fármaco com ácidos nucleicos, pode-se realizar diversas combinações, de acordo com o grau do câncer de pele a ser tratado, bem como o tipo, condições, particularidades do paciente, de modo a se obter uma terapia individualizada efetiva, que culmine em redução tumoral.



Figura 4. Esquema no nanosistema lipídico - Carreador lipídico nanoestruturado (CLN) contendo 5-fluorouracil e pool de siRNAs - Bcl-2 + Gli-1 + EGFR.

Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente projeto de doutorado visou o desenvolvimento, caracterização e avaliações *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de um CLN multifuncional capaz de encapsular um antitumoral (5-fluorouracil) e complexar eficientemente uma associação de siRNAs (*pool*) específicos, objetivando uma terapia específica que possa atuar inibindo as diferentes vias moleculares do câncer de pele.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar a produção do CLN por homogeneização à alta pressão;
- Iniciar estudos de escalonamento de produção do CLN;
- Caracterizar o CLN quanto aos parâmetros físico-químicos por Espalhamento de luz dinâmico (DLS), Rastreamento de nanopartículas (NTA), Termogravimetria (TGA), Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e Espectroscopia por infravermelho em transformada de Fourier (IFTR) e aspecto morfológico utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Encapsular o 5-FU e complexar eficientemente os siRNAs;
- Realizar estudo de estabilidade tanto do CLN em suspensão como liofilizado;
- Executar estudos de liberação de todos os volumes de preparo do CLN contendo 5-FU;
- Estudar o comportamento, bem como retenção e permeação do 5-FU, nas plataformas de estudos cutâneos *ex vivo* e *in vitro*;
- Padronizar esferoides 3D das linhagens tumorais estudadas;
- Determinar perfis de toxicidade celular bem como transfecção do CLN em suas diversas combinações de tratamento nas linhagens celulares em plataforma 2D e 3D;
- Estudar sobre a via de internalização do CLN;
- Realizar experimentos *in vitro* de atividade antitumoral, sendo eles determinação da ação do CLN em suas diversas combinações, sobre a capacidade migratória das células tumorais, padrão de invasão, apoptose e necrose, bem como efeito na proliferação;
- Obter o modelo xenográfico de câncer de pele e avaliar ação antitumoral do CLN multifuncional proposto.

Material e Métodos

3.1. Material

5-Fluorouracil (≥99% - Sigma Life Science, EUA); Palmitoestearato de Glicerila (Precirol-ATO-5[©], Gattefossé, França); Triglicerídeo do Ácido Cáprico/Caprílico (Labrafac Lipophile[®], Gattefossé, França); 2-Dioleoil 3-trimetilamônio propano (DOTAP[®] - Avanti Polar Lipids, EUA); Poloxamer 188 (Kolliphor P[©], Sigma Life Science, EUA); siRNA controle (ThermoFisher Scientific, EUA), siRNA Alexa 647 (ThermoFisher Scientific, USA); siRNAs específicos para BCL-2, Gli-1 e EGFR (Ambion, ThermoFisher Scientific, EUA); Membrana de diálise (Invitrogen, EUA), Lipofectamina 2000® (Invitrogen, EUA); Rezasurina (Sigma Aldrich, EUA); Azul de Tripam (Gibco, EUA); DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich, EUA); Tripsina 10X (Sigma Aldrich, EUA); Piruvato de sódio 100 mM (Gibco, EUA); Soro bovino fetal (Sigma Aldrich, EUA); TissueTeck[®] (Fisher Healthcare, EUA); lodeto de Propídio (Sigma Aldrich, EUA), Agarose ultrapura (Invitrogen, EUA); DAPI (Merck, Sigma Aldrich, USA); Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, EUA), Hexadecil-trimetil-amônio (H-TAB) (Sigma Aldrich, EUA); Tetra-metil-benzidina (TMB) (Sigma Aldrich, EUA); Bcl-2 e TNF-α ELISA Kit (Abcam, EUA); Anticorpo Anti-Ki67 Alexa 647 (DBR Biotec, Brasil); DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Brasil).

3.2. Quantificação do 5-FU por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O fármaco 5-FU foi quantificado através de método bioanalítico previamente desenvolvido e validado (ROSA, 2019) através de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo (Shimadzu LC 10AD), acoplado ao detector UV-visível (SPD 10A). O comprimento de onda de trabalho foi de 265 nm. A coluna cromatográfica foi uma C8 (Phenomenex 100 mm x 4,6 mm, 5, 110 A) inserida no compartimento de forno controlado por um termostato (CTO 10A) à 25°C. A fase móvel foi composta de Metanol (10): Água (90) v/v, acidificada com 0,05% (v/v) de ácido ortofosfórico (pH 4,5). O sistema utilizado contém um auto injetor (SIL 10AF) e o volume de injeção de amostra foi de 30 µL. A vazão de fase móvel utilizada foi 0,8 mL/min. O software utilizado para aquisição de dados foi CLASS VP.

3.3. Estudos farmacotécnicos preliminares

O Carreador lipídico nanoestruturado (CLN) (Tabela 1) foi preparado através de Homogeneização a alta pressão a quente (Avestin, Espanha). Estudos farmacotécnicos iniciais se basearam em um volume de formulação de 20 mL.

Inicialmente, a formação de uma pré-emulsão via dispersão em Turrax (IKA, EUA) foi avaliada. Onde, a fase aquosa, composta pelo tensoativo, água e 5-FU (quando aplicável) foram aquecidos à 70°C e vertidos sobre a fase oleosa fundida à mesma temperatura. Então, os tempos de formação de pré-emulsão estudados foram: 1, 2, 3, 4 e 5 minutos, e as rotações estudadas foram 12000 e 20000 rpm.

Em seguida, foram estudadas a influência do tempo e pressão de homogeneização, recolhendo amostras de 200 µL nos seguintes tempos: 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 minutos submetidos às seguintes pressões: 500, 750, 1000 e 1500 Bar. As amostras foram avaliadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Por fim, a partir dos dados gerados nos ensaios preliminares, foram realizados Planejamentos experimentais fracionados (2⁴⁻¹ Resolução IV), utilizando o software Statistica 13.5, de modo a entender a influência estatística de cada fator (Agitação, tempo de agitação, pressão e tempo de homogeneização) no preparo do CLN e escolher as variáveis adequadas para a otimização do preparo deste nanossistema utilizando o Homogeneizador de alta pressão.

Formulação	CLN 5-FU		CLN controle		
Componente	Quantidade (mg)	Porcentagem	Quantidade (mg)	Porcentagem	
Palmitoestearato de Glicerila	60	0,3	60	0,3	
Triglicerídeo Ac. Cáprico/Caprílico	20	0,1	20	0,1	
DOTAP	20	0,1	20	0,1	
Poloxamer 188	150	0,75	150	0,75	
5-Fluorouracil	10	0,05	-	-	
Água ultrapurificada	19740	98,7	19750	98,7	

Tabela 1. Composição do carreador lipídico nanoestruturado (CLN), controle e contendo 5-FU (500 µg/mL), e a porcentagem de cada componente em relação do volume total de preparo (20 mL).

3.4. Otimização da nanoestrutura utilizando a estratégia de *Design of Experiments* (DoE)

A otimização do CLN foi realizada baseada na otimização dos Parâmetros Críticos de Processo (PCP), que neste caso estão relacionados aos parâmetros dos equipamentos utilizados no preparo do CLN. Estes parâmetros, denominados fatores independentes, foram: (i) Agitação (rpm), (ii) Pressão de homogeneização (Bar) e (iii) Tempo de homogeneização (Tabela 2). Utilizou-se um modelo de superfície de resposta, Design Composto Central (DCC), de modo a possibilitar não só a compreensão a respeito das interações entre as variáveis, bem como a otimização destas para obtenção da resposta desejada. Os fatores independentes e os níveis foram determinados utilizando os resultados dos planejamentos experimentais fracionados realizados anteriormente. Os fatores dependentes, denominados respostas ou fatores dependentes, foram: diâmetro de partícula, índice de polidispersão (PdI) e eficiência de encapsulação (%EE). As análises foram realizadas utilizando o Software Statistica 13.5. Todas as análises de DLS seguiram o padrão de diluição que melhor se adequava a amostra.

		Intervalos e Níveis				
Fatores independentes	Código	-1,682	-1	0	+1	+1,682
Agitação (rpm)	X1	6591	12000	15000	20000	23409
Pressão de homogeneização (Bar)	X2	330	500	750	1000	1200
Tempo de homogeneização (min)	Х3	3,5	12	24,5	37	45,5

Tabela 2. Intervalos e níveis dos fatores independentes investigados.

Um modelo polinomial de segunda ordem que inclui as relações lineares, interações entre os fatores, bem como os efeitos quadráticos foram obtidos (Equação (1)). Esse modelo polinomial de segunda ordem é razoavelmente flexível e descreve a curvatura e as interações, o que o torna um modelo adequado para otimizar processos e inferir fenômenos não triviais (TAVARES LUIZ et al., 2021).

$$y = \beta_{0+} \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$
(1)

Na equação y é a resposta, βo é o termo constante do modelo, xi são

as variáveis codificadas (i = 1, 2..., k), β i são os coeficientes dos termos lineares, β ii são os coeficientes dos termos quadráticos, β ij são os coeficientes das interações dos, e por fim ε é o componente de erro aleatório, determinado pelo ajuste do modelo aos dados.

O modelo ajustado descreve a relação entre os dados adequadamente para que as previsões dentro da região experimental possam ser feitas com precisão. Desta forma, o modelo matemático pode ser considerado adequado quando a regressão é estaticamente significativa e não apresenta um erro (falta de ajuste). Além disso, o coeficiente de determinação (R²) e o coeficiente ajustado de determinação (Ra²dj) representam a porcentagem de variância explicado pelo modelo. Portanto, quanto mais próximos esses coeficientes estiverem de 1, melhor a regressão representa estatisticamente os dados. Assim, com uma regressão significativa, a superfície de resposta pode ser obtida e utilizada para otimizar o modelo.

Após realizadas as análises dos modelos e as adequações estatísticas, a otimização do sistema foi realizada de modo a se obter tamanhos de partícula por volta de 250 nm, menores PdI possíveis e maiores %EE.

3.5. Estudos iniciais de escalonamento – Scaling up

Após otimização do preparo do CLN em homogeneizador de alta pressão, estudos iniciais de escalonamento foram realizados, de modo a possibilitar o aumento dos volumes de preparo dessa nanoestrutura. O volume final de preparo no qual o CLN foi otimizado foi de 20 mL, e a partir deste volume foram estudados aumentos até 10 vezes maiores, sendo estes 50, 100, 150 e 200 mL. Com o objetivo de se obter o CLN com as mesmas características do otimizado, inicialmente replicou-se os parâmetros determinados na otimização, e em seguida, ajustes mínimos no tempo de homogeneização foram feitos de modo a manter as características otimizadas.

3.6. Caracterização físico-química do CLN

3.6.1. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

O CLN foi caracterizado quanto ao seu diâmetro de partícula, bem como seu índice de polidispersão (PdI) e cargas superficiais. Essa caracterização foi

realizada por espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética. Ambas foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) equipado com um laser He-Ne de 633 nm operando em um ângulo de 173°. Durante testes preliminares, planejamento experimental fracionado e planejamento de superfície de resposta, cada CLN foi analisado na diluição determinada. Após processo de otimização, a diluição do CLN foi padronizada na proporção 1:100, (v/v) em água ultra purificada, para análise de diâmetro e PdI, e em KCI (0,05 nM) para determinação de potencial zeta. Para diâmetro e PdI, o CLN diluído foi analisado em uma cubeta de quartzo com um comprimento de trajeto de luz de 10 mm a 25°C e índice de refração utilizado de 1,33. Para potencial zeta, o CLN diluído foi analisado em uma célula de eletroforese capilar padrão. O equipamento realizou automaticamente uma média de 14 determinações para cada análise com um tempo de repouso de amostra de 30 segundos.

3.6.2. Análise rastreamento de nanopartículas (NTA)

As análises de NTA foram realizadas utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern, Reino Unido) contendo uma câmara acoplada de alta sensibilidade, e laser de 642 nm (potência de saída 40 mW). O CLN nos 5 diferentes volumes de preparo (20, 50, 100, 150 e 200 mL) foram diluídos (1:1000, v/v) em água ultra-purificada, livre de partículas, e injetada na câmara da amostra com uma seringa estéril (BD Plastipak, Paraná, Brasil) até que o conteúdo tivesse atingido a ponta do bocal. As medições foram realizadas a 25°C e adquiridas por 30 segundos com obturador manual. Os ajustes de ganho foram realizados de maneira que fosse possível observar melhor a amostra e remover ruídos. O resultado foi expresso pelo diâmetro médio ± desvio padrão obtido com o software NTA.

3.6.3. Eficiência de encapsulação (%EE) e drug loading (%DL)

O 5-FU é um fármaco de característica hidrofílica e por este motivo a metodologia adotada na determinação de %EE e %DL foi a ultrafiltração/ centrifugação através de dispositivos Amicon[®] (Millipore) 50 KDa. As condições de análise foram: 500 μ L de amostra de CLN centrifugados a 5 minutos a 3000 *x* g. O conteúdo presente no ultrafiltrado foi quantificado em CLAE através do

método descrito no item 3.2 e através das áreas cromatográficas obtidas as %EE e %DL foram determinadas indiretamente, utilizando as Equações (2) e (3), respectivamente.

$$\% EE = \frac{Quantidade Total de 5-FU utilizada - Quantidade de 5-FU no ultrafiltrado}{Quantidade Total de 5-FU utilizada} x 100$$
(2)
$$\% DL = \frac{Quantidade Total de 5-FU utilizada - Quantidade de 5-FU no ultrafiltrado}{Quantidade Total de lipídios} x 100$$
(3)

A determinação direta da %EE e %DL também foram realizadas através do rompimento das nanopartículas remanescentes no filtro Amicon[®], utilizando 200 μ L de DMSO. Após rompimento da nanoestrutura a amostra foi submetida a centrifugação, 10 minutos à 4°C em 5000 *x* g, e o conteúdo sobrenadante foi também analisado em CLAE.

3.6.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise morfológica foi realizada em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Jeol, modelo JEM-100CX II). Esta análise se baseia na emissão de um feixe de elétrons em direção a uma amostra ultrafina, interagindo com a mesma enquanto a atravessa. A interação dos elétrons transmitidos através da amostra forma uma imagem que é ampliada e focada em um dispositivo de imagem.

 $5 \ \mu$ L do CLN (controle e com 5-FU) foram pipetados sobre a grelha, de 3,05 mm de diâmetro, com espessura e malhas de 100 μ m e a análise procedeuse quando a amostra havia secado. Esta grelha foi inserida no porta-objetos, que corresponde à platina com eclusas de ar para permitir a inserção do suporte da amostra no vácuo. As imagens foram obtidas nos aumentos de 100.000x, 200.000x e 370.000x.

3.6.5. Estudos de estabilidade e Liofilização do CLN

Os estudos de estabilidade foram baseados em duas condições: CLN em dispersão e CLN liofilizado. O CLN controle em dispersão em todos os seus volumes de preparo, foram submetidos a ensaio de estabilidade quanto ao seu diâmetro, PdI e potencial zeta durante 60 dias armazenados a 4°C. O CLN 5-FU em todos os seus volumes de preparo foram analisados durante 60 dias

armazenados a 4°C para diâmetro, PdI, potencial zeta e durante 30 dias para %EE e %DL.

O ensaio de estabilidade também foi realizado com o CLN liofilizado. 20 mL do CLN, em todos os volumes de preparo, recentemente preparados foram congelados em -20 °C sem adição de agentes crioprotetores, e foram liofilizados (Liofilizador L101, Liotop, Brasil) a -40°C submetido a vácuo < 500 mmHg durante 36 horas. Após 30 dias do processo de liofilização, os conteúdos liofilizados foram ressuspensos em água ultrapurificada, proporcionalmente a sua concentração na dispersão, sendo 13,0 mg/mL de material sólido dos CLN controle e 13,5 mg/mL dos CLN contendo 5-FU. As suspensões de CLN em água ultra purificada foram agitadas durante 1 minuto em Vortex (IKA, Genius 3, velocidade 5), seguido de banho de ultrassom por 5 minutos e mantidas *overnight* sob agitação lenta (200 rpm). Os CLN ressupensos foram analisadas quanto ao seu diâmetro, PdI, potencial zeta, %EE e %DL. Os CLN liofilizados foram também utilizados para as análises de TGA e DSC.

3.6.6. Análises termogravimétricas (TGA)

As análises térmicas foram realizadas utilizando um equipamento TGA50 (Shimadzu Inc, Tokyo, Japan), no qual 10 mg de cada amostra (componentes do CLN e CLN em seus diversos volumes) foi inserida no compartimento de amostra e então aquecida em rampa até sua completa degradação térmica. O CLN foi analisado em todos seus volumes de preparo, contendo ou não 5-FU. A temperatura de degradação determinada em TGA foi utilizada na determinação das rampas para análises de DSC. Essa análise também foi utilizada para detecção de mudanças de padrões de degradação nas variações de preparo do *saling up* do CLN.

3.6.7. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de DSC foram realizadas por um equipamento Jade DSC (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA) e o software PyrisTM (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA) para processamento de dados. Utilizaram-se 5 mg de todos os componentes do CLN, bem como 5 mg do CLN em todos seus volumes de preparo, contendo ou não 5-FU. As amostras foram colocadas em um compartimento de alumínio sob atmosfera de nitrogênio (3

56

Kgf/cm²) e submetidas à análise. Um compartimento vazio semelhante foi usado como referência. A rampa de aquecimento de análise foi de 20 °C a 350 °C a uma taxa de 10 °C/min. Esta análise foi realizada com o intuito de se avaliar qualquer possível transição de fase e/ou aparecimento de novos compostos após a formação do CLN, bem como a semelhança entre os volumes de preparo do *scaling up*.

3.6.8. Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Perkin-Elmer FTIR 2000, Cambridge, UK) tiveram seus espectros registrados na faixa de 400-4000 cm⁻¹, sob temperatura ambiente. Utilizaram-se 5 mg de todos os componentes do CLN, e 5 mg do CLN controle e do CLN 5-FU liofilizados para preparo de pastilhas de KBr e assim foi realizada a análise.

3.7. Complexação e Estabilidade do complexo

A técnica utilizada para verificar a eficiência de complexação do siRNA ao NLC foi eletroforese em gel de agarose, com corrida eletroforética (Electrophoresis Power Supply, UK) a uma tensão constante de 100 V por 20 minutos em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) (pH 8,0).

Os siRNAs foram revelados através de um corante fluorescente ultrasensível que se liga a ácidos nucleicos (Gel Red[®] 10000X, Millipore, EUA), e a visualização foi realizada em 302 - 312 nm sob um Transluminator (Loccus Biotecnology, BR). A aquisição de imagens foi obtida usando o software Quantity One.

Avaliou-se uma curva de concentrações de siRNA controle negativo (*scrambled*) e siRNAs específicos *versus* o brilho apresentado por cada concentração, bem como a resolução das bandas, em 3 condições de dureza do gel: 1,0%, 1,5% e 2,0% de agarose (m/v). Seguido da definição do gel adequado avaliou-se a complexação do CLN com os siRNAs, nas razões nitrogênio / fosfato (N/P) 0,5; 1; 2; 5; 10 e 20, bem como sua descomplexação através de competição aniônica utilizando heparina (5000 UI/mL).

Foram utilizados os controles: água livre de RNAse (CT-), CLN (CT-), siRNA controle livre (CT+), heparina livre (CT-).

3.8. Estudos de Liberação

Para este estudo foi utilizado uma membrana sintética (33 mm, 23 µm e diâmetro de 21 in., 12000 a 14000 Daltons, Fisherbrand) em Célula de difusão de Franz (Hanson Instruments, EUA). A membrana foi lavada, com a finalidade de remoção de resíduos que pudessem interferir na análise, e hidratada em água purificada, 24 horas antes do experimento. No momento do uso, a membrana foi cortada em tamanho ideal para cobrir a área de permeação (1,77 cm²) da célula de difusão de Franz. A célula de Franz foi montada com os aparatos próprios para o CLN (dispersão líquida). A solução receptora foi composta por tampão fosfato isotônico (pH 7,4±0,2) e este estudo foi realizado em condições de *sink* com dose infinita. 1000 µL do conteúdo permeado foi coletado (n=4) nos tempos: 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas, e foi analisado em CLAE através de método anteriormente desenvolvido e validado (item 3.2).

As áreas cromatográficas foram quantificadas a partir da equação da reta do método bioanalítico validado em CLAE e os resultados foram avaliados seguindo a Equação (4), abaixo, onde, $Q_{calculada,t}$ representa a quantidade de 5-FU calculada baseada na concentração liberada por área e por unidade de tempo, $C_{calculada,t}$ representa a concentração calculada no tempo em questão, V*r* indica o volume da célula de difusão, V_a indica o volume de amostra removida, C_{α} representa a concentração da amostra removida.

$$Q_{calculada,t} = C_{calculada,t} \cdot V_r + V_\alpha \cdot \sum^{n-1} C_\alpha$$
(4)

Após, as concentrações liberadas foram avaliadas de acordo com os modelos de cinéticas de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell.

3.9. Estudos cutâneos

Os experimentos com pele (material biológico) de seres humanos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, através da Plataforma Brasil, sob registro com o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) nº 24493619.2.0000.5403 (Anexo II).

Para estes estudos foram utilizadas peles de descarte de cirurgias de abdominoplastias realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e os pacientes doadores assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo I).

O fragmento de pele, após cirurgia, foi colocado em um recipiente de vidro estéril, hermeticamente fechado e mantido em caixa térmica para ser transportado até o Laboratório de Cicatrização e Hanseníase da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. O fragmento foi, a partir de então, manipulado somente no interior de cabine de fluxo laminar com materiais estéreis de modo a garantir condições de ausência de microrganismos que interfiram na viabilidade do tecido. O tecido foi incubado com uma solução a 1% (v/v) de antibiótico e antimicótico por 4 horas.

A pele foi examinada e a área mais homogênea foi escolhida, de modo a não contemplar regiões onde houvesse manchas, pintas, sardas, tatuagens, excesso de pelos e outros possíveis interferentes de absorção cutânea. A camada subcutânea e derme profunda foram removidas com o auxílio de um bisturi e tesoura e em seguida, a pele remanescente foi seccionada em fragmentos de 1 cm² para a viabilidade tecidual e *ex vivo* (hOSEC) e 2 cm² para a permeação *in vitro* em Célula de Franz (Figura 5).



Figura 5. Esquema dos estudos cutâneos sendo eles os estudos *ex vivo* utilizando o modelo explante hOSEC e *in vitro* utilizando célula de difusão de Franz. O hOSEC foi realizado por 15 dias e a célula de Franz 24 horas.

3.9.1. Viabilidade tecidual – Cloreto de trifenil tetrazólio (TTC)

Os fragmentos foram expostos ao CLN controle, CLN 5-FU e solução 5-FU da mesma forma que seriam expostos nos experimentos de permeação *ex vivo*, desta forma, 10 μ L (10¹⁰ NPs / 5 μ g) de ambos foram aplicados sobre os fragmentos. Em 24 horas, 5, 10 e 15 dias a viabilidade do tecido cutâneo foi avaliada através do Cloreto de trifenil tetrazólio (TTC).

Após tempo de exposição, os fragmentos foram transferidos para uma placa de 24 poços, com a epiderme voltada para baixo. Foram acrescidos aos poços 1000 μ L de TTC (2%, m/v) preparado em meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol. As placas foram incubadas à 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) durante 2 horas.

Seguido da incubação, os fragmentos foram lavados com tampão fosfato isotônico (pH 7,4±0,2) e secos em papel. Em placas de 24 poços foram novamente posicionados, um fragmento por poço contendo mistura de DMSO: etanol (1:1) para solubilização dos cristais de TTC. As placas foram protegidas da luz e armazenadas sob agitação leve durante 12 horas em temperatura ambiente.

A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas BioStack Ready (Biotec Synergy 2, EUA) em 485 nm (n=3 cada).

3.9.2. Estudos in vitro de permeação e retenção cutânea em pele humana

Os fragmentos de 2 cm² foram posicionados na célula de difusão de Franz (Hanson Instruments, EUA) que possui área de permeação de 1,77 cm². A solução receptora foi composta por tampão fosfato isotônico (pH 7,4±0,2) sob agitação de 300 rpm à 32°C. Este estudo foi realizado em condições de *sink* com dose infinita, desta forma foram aplicados 1000 μ L do CLN 5-FU e da solução aquosa 5-FU no compartimento de amostra. 1000 μ L do conteúdo permeado foi coletado (n=3) nos tempos: 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,12, 15, 18 e 24 horas, e foi analisado por CLAE através de método bioanalítico anteriormente desenvolvido e validado (item 3.2).

As concentrações de 5-FU permeados através do tempo foram obtidas a partir da equação 5, onde: Q_{calculada,t} representa a quantidade de 5-FU calculada baseada na concentração permeada por área e por unidade de tempo; C_{calculada,t}

representa a concentração calculada no tempo em questão; V_r indica o volume da célula de difusão; V_a indica o volume de amostra removida; C_a representa a concentração da amostra removida.

$$Q_{calculada,t} = C_{calculada,t} \cdot V_r + V_\alpha \cdot \sum^{n-1} C_\alpha$$
(5)

3.9.3. Estudos ex vivo de permeação e retenção cutânea em pele humana

Os fragmentos de 1 cm² foram posicionados, um fragmento por poço, em placas de 12 poços, apoiados em grades metálicas. Em cada poço foram colocados 2 mL meio de cultura Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% (v/v) de antibiótico e antimicótico. A epiderme permaneceu acima da interface meio/ar. As placas foram incubadas a 37°C sob atmosfera de CO₂ (5%).

10 μL de CLN multifuncional (10¹⁰ NPs) foi aplicado sobre os fragmentos de pele, diariamente, durante 14 dias. A aplicação tópica também foi realizada para solução de 5-FU (500 μg/mL) como controle experimental. A cada 24 horas (n=3) foi realizado o doseamento, em CLAE, do 5-FU retido nas camadas da pele bem como no meio de cultura.

O fragmento foi retirado da incubadora, separado do meio de cultura correspondente, teve o excesso de meio levemente removido da derme profunda, e o estrato córneo também foi levemente pressionado com papel, de modo a remover o conteúdo que não foi absorvido pelo tecido.

Para remoção do estrato córneo, foi adotado o método de *tape striping*, onde 20 fitas adesivas foram pressionadas em sequência para remover essa camada da pele e o 5-FU contido nela. A pele remanescente, epiderme viável e derme foram posicionadas em placas de 6 poços, com a derme para baixo submersa em tripsina 5X *overnight*. Deste modo a epiderme e derme se soltaram, através do rompimento da camada basal. A epiderme foi triturada em água ultrapura e metanol (1:4) e a derme foi triturada no conteúdo da tripsina acrescido de metanol. As fitas passaram por agitação em água ultrapura e metanol (1:4) para extração do 5-FU. Os conteúdos foram filtrados em 0,45 µm seguido de 0,22 µm e aplicados em CLAE.

Foi avaliada a integridade do tecido através de cortes histológicos da pele a cada 24 horas, tanto para os CLNs como para a solução do fármaco. Os cortes foram corados com hematoxilina/eosina e foram comparados com o tecido que não recebeu nenhum tratamento (controle), com o mesmo tempo de cultivo tecidual.

3.10. Ensaios Celulares

As linhagens celulares utilizadas foram: HaCaT (queratinócitos humanos não tumorais), A431 (Carcinoma epidermóide humano), A375 (Melanoma cutâneo humano), Sk-mel-103 (Melanoma humano resistente), 1205Lu (Melanoma metastático humano). Bancos mãe e bancos de trabalho foram padronizados. O congelamento das linhagens procedeu-se 10⁶ células por criotubo, em 1000 µL de SBF acrescido de 10% de DMSO, inicialmente em - 80°C e transferido a nitrogênio líquido após 24 horas.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em DMEM acrescido de 10% (v/v) de SBF e 1% (v/v) de antibiótico e antimicótico, nas condições de 37°C e 5% de CO₂. Para a linhagem A431 houve o uso de Piruvato de sódio (1%, v/v) no cultivo inicial, após descongelamento.

As linhagens foram tripsinizadas sempre que a confluência de crescimento fosse superior a 80% e todos os experimentos foram realizados na fase Log de crescimento e monitorando a viabilidade das mesmas utilizando azul de tripam.

3.10.1. Determinação da cinética de crescimento celular e tempo de duplicação (*Doubling time*)

Tempo de duplicação é o tempo que a população celular leva para dobrar sua população. E este tempo pode ser calculado baseado em curvas de crescimento (cinéticas) em determinados tempos, de acordo com a Equação (6).

As linhagens tumorais A431, A375, Sk-mel-103, 1205Lu, e a linhagem não tumoral HaCaT, foram cultivadas em frascos de cultura celular de 25 cm² a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂ com densidades celulares diferentes (1 x10⁵ para HaCaT e A431; 5 x10⁴ para 1205Lu e Sk-mel-103 e 2,5 x10⁴ para A375), devido ao tamanho celular e à velocidade de crescimento, com o intuito de se determinar todos os estágios do crescimento: fase Lag, fase Log e fase de morte celular. Para determinação da cinética de crescimento de cada linhagem, a mesma foi observada quanto ao crescimento durante 7 dias (n=3 por dia). A cada 24 horas foram tripsinizados 3 frascos de cada linhagem, e as células foram contadas utilizando câmara de Neubauer. Os dados de cinética de crescimento foram apresentados em média e desvio padrão plotados em uma mesma escala para que se pudesse observar as diferenças de crescimento entre as linhagens. Ao final do estudo de cinética, foi realizado o cálculo de tempo de duplicação celular *(doubling time)*, onde pode-se observar quanto tempo cada linhagem leva para dobrar sua população, este é um importante dado para entender futuros comportamentos de crescimento das linhagens diante um tratamento.

$$DT = T_f x \frac{\ln 2}{\ln^{n^{\circ} cells_{T_f}} / n^{\circ} cells_{T_0}}$$
(6)

Na equação Dt é *doubling time*, e este se determina pelo tempo de observação (Tf= tempo final) vezes uma relação de dois logaritmos neperianos, que consegue correlacionar o crescimento das células no tempo inicial (To) com o número que havia no tempo final (Tf).

3.10.2. Estudos de Viabilidade Celular em cultivo bidimensional (2D)

O ensaio foi realizado utilizando rezasurina, um corante que apresenta uma coloração azulada e na presença de células viáveis é convertido em rezofurina, que por sua vez tem como característica ser fluorescente. Desta forma, a quantificação da fluorescência foi correlacionada com a viabilidade através da atividade mitocondrial.

As linhagens foram sub-cultivadas em placas de 96 poços (200 μ L de meio de cultura por poço) à uma densidade celular de 1x10⁴ células por poço, e incubadas por 24 horas, nas mesmas condições de cultivo, para adesão das células à placa e formação da monocamada (2D). Após adesão, um novo meio de cultura, contendo os tratamentos a serem avaliados, foi aplicado nas placas. Cada tratamento foi aplicado em 10 diluições diferentes, 4 réplicas cada, em duas análises independentes. Os siRNAs livres foram avaliados como controle. Os tratamentos foram realizados por 24 horas, após decorrido este tempo, o conteúdo dos 96 poços foi retirado e os poços foram lavados 3 vezes com tampão fosfato de sódio, pH 7,4 (PBS). Por fim, foi adicionado, novo meio de cultura contendo rezasurina (25 μ g/mL) e então as placas foram incubadas durante 4 horas nas mesmas condições de cultivo celular. A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas BioStack Ready (Biotec Synergy 2, EUA) sob as seguintes condições: Excitação: 530/25, Emissão: 590/35; Espelho: Top 50%, Ganho: 35.

3.10.3. Desenvolvimento e padronização dos esferoides tridimensionais
 (3D)

O desenvolvimento e padronização de esferoides 3D foram realizados nas linhagens tumorais através da técnica de flutuação forçada de acordo com Amaral *et al.* (2017) e Luiz *et al.* (2021) (AMARAL et al., 2017; LUIZ et al., 2021) com adaptações.

Inicialmente foram avaliadas diferentes densidades celulares, e após, selecionou-se 6 densidades para monitoramento durante 7 dias sendo estas: 1000, 2000, 3000, 5000, 10000 e 20000 células para as linhagens de melanoma, A375, Sk-mel-103 e 1205Lu, e 1000, 2000, 5000, 10000, 20000 e 40000 células para a linhagem A431. Os esferoides gerados foram fotografados e acompanhados durante 7 dias de crescimento, e tiveram seu diâmetro e esfericidade determinados através do Software ImageJ NIH.

Os esferoides foram selecionados nas condições que apresentassem diâmetro entre 200 - 300 µm, parâmetro de circunferência e arredondamento o mais próximo a 1, o que quer dizer o mais esférico possível.

3.10.4. Estudos de Viabilidade Celular em cultivo tridimensional (3D)

Após padronização dos esferoides de cada linhagem tumoral, os mesmos foram preparados em placas de 96 poços, e os mesmos tratamentos realizados para a organização 2D foram aplicados, também durante 24 horas.

Após decorridas 24 horas, o tratamento foi retirado e os esferoides foram lavados 3 vezes com tampão fosfato de sódio, pH 7,4 (PBS), e um novo meio de cultura contendo rezasurina (50 µg/mL) foi adicionado e incubado durante 24 horas nas mesmas condições de cultivo celular. A leitura de fluorescência foi realizada em uma leitora de microplacas BioStack Ready (Biotec Synergy 2, EUA) sob as seguintes condições: Excitação: 530/25, Emissão: 590/35; Espelho: Top 50%, Ganho: 35.

3.10.5. Uptake celular em Microscopia Confocal

A transfecção celular *in vitro* foi avaliada por Microscopia Confocal (Leica Microsystems Inc., EUA) tanto para o cultivo em 2D como em 3D. Para a condição em 2D, as células foram sub-cultivadas em placas de 6 poços (2 mL de meio de cultura por poço), contendo uma lamínula circular, à uma densidade celular de 1 x 10⁵ células por poço. O CLN controle marcado com siRNA Alexa-647 (40 nM) foi inserido, após adesão celular à lamínula, a uma concentração de 3x10⁸ nanopartículas por poço.

A transfecção foi avaliada nos tempos de 1, 2, 4 e 24 horas. Após decorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído a 4% (v/v). Após fixação, foram realizadas 3 lavagens com PBS, e em seguida uma solução de DAPI (0,3 µg/mL) foi aplicada às células por 10 minutos. As células foram novamente lavadas 3 vezes e as lamínulas foram transferidas para uma lâmina de vidro contendo Fluoromount[™].

Para o cultivo 3D, os esferoides preparados seguindo suas diferentes padronizações foram expostos a 1x10⁹ nanopartículas para cada esferoide, incubados durante 24 horas. Após decorrido o tempo de incubação, os esferoides foram lavados 3 vezes com PBS e fixados com uma solução de paraformaldeído a 4% (v/v). Após fixação, foram realizadas 3 lavagens com PBS, e em seguida uma solução de DAPI (0,5 µg/mL) foi aplicada às células por 4 horas.

Neste ensaio, a Lipofectamina 2000[®] foi utilizada como controle positivo de transfecção, e siRNA Alexa 647 livre foi utilizado como controle. As imagens foram adquiridas com objetiva de imersão de 40 ×, λ = 405 nm e λ = 638 lasers, adequadas para DAPI e Alexa 647, respectivamente. A intensidade do brilho emitido foi quantificada em ImageJ NIH.

3.10.6. Uptake celular em Citometria de fluxo

A transfecção celular *in vitro* também foi avaliada em citometria de fluxo (BD FACSCanto I, FlowJo). Para tal, para avaliação em 2D, as linhagens foram sub-cultivadas a uma densidade 5 x 10⁵ em placas de 24 poços. O CLN controle marcado com siRNA Alexa-647 (40 nM) foi inserido, após adesão celular, a uma concentração de 3x10⁸ nanopartículas por poço. Para avaliação em 3D, os esferoides padronizados foram também expostos ao CLN marcado com siRNA Alexa-647 (40 nM) (1x10⁹ nanopartículas para cada esferoide). Após 24 horas, tanto a cultura em 2D como em 3D foram lavadas com PBS e tripsinizadas, inseridas em tubos de citometria contendo lodeto de propídio (1 mg/mL) para determinação da viabilidade celular.

3.10.7. Determinação da via endocítica de internalização

Para determinação da via endocítica na qual o CLN é internalizado nas células, realizou-se um estudo utilizando inibidores das vias endocíticas.

Utilizou-se para este estudo a linhagem A431, linhagem na qual seria empregada nos estudos *in vivo*. Inicialmente foram avaliadas as concentrações dos inibidores (Tabela 3), de modo a se utilizar as menores concentrações possíveis, apresentando cerca de 90% de viabilidade.

Para isso utilizou-se os inibidores: (i) genisteína, (ii) nistatina e (iii) Metil beta ciclodextrina (MβCD), ambos atuando na inibição da via endocítica mediada por caveolina; (iv) clorpromazina e (v) cloreto e amônio, ambos atuando na via mediada endocítica mediada por clatrina; e por fim (vi) cloridrato de amilorida atuando na via pinocitose.

Tabela 3. Concentrações dos inibidores utilizadas no ensaio de viabilidade de modo a selecionar a concentração ideal para uso no ensaio de determinação da via de internalização (n=4).

Inihidar	Concentrações (µM)								Colosionedo		
Inididor	nº1	n⁰2	n⁰3	n⁰4	n⁰5	n⁰6	n⁰7	n⁰8	n⁰9	n⁰10	Selecionada
Genisteína	50	75	100	150	175	200	250	275	300	350	150 µM
Nistatina	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	10 µM
ΜβCD	0,1	0,5	1	2	4	6	8	10	12	14	2 µM
Clorpromazina	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	10 µM
Cloreto de Amônio	1x10 ⁴	2x10 ⁴	4x10 ⁴	6x10 ⁴	8x10 ⁴	1x10 ⁵	2x10 ⁵	4x10 ⁵	8x10 ⁵	1x10 ⁶	20 mM
Cloridrato de Amilorida	5	10	50	100	150	200	250	300	350	400	50 µM

A viabilidade das células frente aos inibidores foi avaliada utilizando 5x10⁴ células em placas de 96 poços, com a presença dos inibidores durante 8 horas. A viabilidade foi mensurada utilizando resazurina conforme sessão 3.10.2.

Após determinação da concentração atuante como inibidora da via correspondente, 5x10⁴ células foram sub-cultivadas em placas de 24 poços e receberam os inibidores após adesão celular. 1 hora após incubação com os inibidores, o CLN (3x10⁸ nanopartículas) marcado com siRNA Alexa 647 foi inserido (40 nM). A incubação foi realizada durante 8 horas e seguiu-se a leitura

da internalização em citometria de fluxo (BD FACSCanto I, FlowJo) onde a viabilidade celular foi determinada por lodeto de propídio (1 mg/mL).

3.11. Atividade antitumoral in vitro

3.11.1. Estudos de migração celular (*Scratch assay*)

Para compreender a atividade antitumoral *in vitro*, inicialmente foi realizado o experimento de *Scratch*, que auxilia no entendimento sobre a capacidade das células tumorais em migrar.

As células tumorais foram sub-cultivadas em placas de 24 poços numa densidade de 1 x10⁵ células por poço e foram mantidas em incubadora nas condições de cultivo até que alcançassem uma confluência de 100% no poço. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de 200 μ L foi realizado um corte longitudinal, denominado *Scratch*, no centro de cada poço (Figura 6).

As células que desaderiram, foram lavadas 3 vezes com PBS e os poços foram fotografados no momento do corte, denominado tempo zero (T0). O meio de cultura foi adicionado com os devidos tratamentos (Tabela 4) e o fechamento do corte foi acompanhado até que o controle (poço sem tratamento) se fechasse completamente. As porcentagens de fechamento do corte foram obtidas através de quantificação do número de partículas, que no caso foram células, que ocuparam o corte durante o tempo. Essa quantificação foi realizada por ImageJ NIH e através dela pode-se inferir a capacidade dos tratamentos em impedir migração celular.



Figura 6. Esquema do desenvolvimento do ensaio de migração celular, baseado na capacidade das células tumorais em migrarem após *Scratch*, na presença dos tratamentos.

Tabela 4. Tratamentos inseridos após realização do *Scratch* no ensaio de migração celular. Si - siRNA

Tratamentos	Concentrações (NPs / 5-FU / siRNAs)				
CLN controle	5 x10 ⁸ , 1 x10 ⁹ , 5 x10 ⁹ e 5 x10 ¹⁰				
CLN 5-FU	5x10 ⁸ / 2 μM, 1x10 ⁹ / 4 μM, 5x10 ⁹ /, 6 μM e 5x10 ¹⁰ / 10 μM				
5-FU solução	10, 20, 40 e 60 µM				
CLN siBcl-2					
CLN siGli-1					
CLN siEGFR	-				
CLN siScrambled	-				
CLN siBcl-2 + siGli-1					
CLN siBcl-2 + siEGFR	-				
CLN siGli-1 + siEGFR	-				
CLN multifuncional - pool siRNAs	-				
CLN 5-FU + siBcl-2					
CLN 5-FU + siGli-1	-				
CLN 5-FU + siEGFR	- 5x108/2 uM/1 nM 1x109/4 uM/5 nM 5x109/6 uM/10 nM o				
CLN 5-FU + siBcl-2 + siGli-1	5x10°/2 μM/11M, 1x10°/4 μM/51M, 5x10°/6 μM/101M e				
CLN 5-FU + siBcl-2 + siEGFR	3x10 ⁻² / θ μΜ// 13 11M				
CLN 5-FU + siGli-1 + siEGFR	-				
CLN multifuncional - 5-FU + <i>pool</i> siRNAs	·				

3.11.2. Estudos de invasão celular

Para avaliar a capacidade dos tratamentos em inibir a capacidade de invasividade de um tumor de pele, foi realizado o estudo de invasão celular utilizando Transwell (1 µm, Falcon[®]) nas culturas em 2D e 3D da linhagem 1205Lu, uma linhagem caracterizada pela capacidade de sofrer metástase.

O estudo foi realizado de modo a observar e compreender a influência dos tratamentos na capacidade da linhagem 1205Lu em atravessar o poro do Transwell em monocamada (2D) e em sua forma esferoidal (3D).

Inicialmente padronizou-se (Figura 7) a capacidade das células em atravessarem o poro, sem tratamentos, apenas pela influência do soro bovino fetal (SBF) como estimulante. Utilizou-se SBF em ambos os compartimentos, de forma alternada, para determinar o número de células que conseguiria atravessar em cada modelo, 2D e 3D.

Após padronização, em placas de 6 poços, contendo 1 mL de DMEM com 10% de SBF, foram adicionados os Transwell, um por poço, contendo em seu compartimento 1 mL de DMEM sem SBF. 5 x 10⁵ células foram adicionadas por compartimentos do Transwell para avaliação 2D, bem como um esferoide por compartimento, para avaliação 3D. Diversas concentrações dos tratamentos foram avaliadas, e por fim determinou-se àquelas que estavam abaixo do IC₅₀ e demonstraram-se promissoras na inibição da invasão (Tabela 5).

Os tratamentos foram adicionados aos compartimentos dos Transwell e o processo de invasão foi acompanhado por 48 horas. As células que atravessaram, foram tripsinizadas e contadas no tempo de 24 horas e 48 horas, e também tiveram seus núcleos (histonas) marcados com *Hoechst*, para observação de integridade nuclear em Microscópio de Fluorescência (Axioplan 2 Imaging, Zeiss, Alemanha).

Tabela 5. Tratamentos inseridos no compartimento do Transwell no ensaio de
invasão celular tanto em cultivo 2D como 3D da linhagem de melanoma 1205Lu.
N.A - não se aplica, si - siRNA.

Trotomontoo	Concentrações (NPs / 5-FU / siRNAs)				
Tratamentos	2D	3D			
CLN controle	2 x10 ⁹ / N.A / N.A	2 x10 ¹⁰ / N.A / N.A			
CLN 5-FU	6,5 x10 ⁷ / 10 μM / N.A	2 x10 ⁸ / 30 µM / N.A			
5-FU solução	N.A / 10 μM / N.A	N.A / 30 µM / N.A			

CLN siBcl-2	2 x10 ⁹ / N.A / 1 nM	2 x10 ¹⁰ / N.A / 10 nM
CLN si-Gli-1	2 x10 ⁹ / N.A / 1 nM	2 x10 ¹⁰ / N.A / 10 nM
CLN siEGFR	2 x10 ⁹ / N.A / 1 nM	2 x10 ¹⁰ / N.A / 10 nM
CLN siScrambled	2 x10 ⁹ / N.A / 1 nM	2 x10 ¹⁰ / N.A / 10 nM
CLN siBcl-2 + siGli-1	2 x10 ⁹ / N.A / 1 nM	2 x10 ¹⁰ / N.A / 10 nM
CLN siBcl-2 + siEGFR	2 x10 ⁹ / N.A / 1 nM	2 x10 ¹⁰ / N.A / 10 nM
CLN siGli-1 + siEGFR	2 x10 ⁹ / N.A / 1 nM	2 x10 ¹⁰ / N.A / 10 nM
CLN multifuncional - <i>pool</i> siRNAs	1 x10 ⁹ / N.A / 0,5 nM	1 x10 ¹⁰ / N.A / 5 nM
CLN 5-FU + siBcl-2	2,2 x10 ⁷ / 3 µM / 0,2 nM	1,3 x10 ⁸ / 20 µM / 1 nM
CLN 5-FU + siGli-1	6,5 x10 ⁷ / 10 μM / 1 nM	1,3 x10 ⁸ / 20 µM / 1 nM
CLN 5-FU + siEGFR	6,5 x10 ⁷ / 10 μM / 1 nM	1,3 x10 ⁸ / 20 µM / 1 nM
CLN 5-FU + siBcl-2 + siGli-1	2,2 x10 ⁷ / 3 µM / 0,2 nM	1,3 x10 ⁸ / 20 µM / 1 nM
CLN 5-FU + siBcl-2 + siEGFR	5 x10 ⁷ / 8 µM / 0,5 nM	1,3 x10 ⁸ / 20 µM / 1 nM
CLN 5-FU + siGli-1 + siEGFR	5 x10 ⁷ / 8 μM / 0,5 nM	1,3 x10 ⁸ / 20 µM / 1 nM
CLN multifuncional - 5-FU + <i>pool</i> siRNAs	2,2 x10 ⁷ / 3 µM / 0,2 nM	1,3 x10 ⁸ / 20 µM / 1 nM



Figura 7. Esquema da montagem e padronização do ensaio de invasão em Transwell: (A) Em placas de 6 poços foram adicionados os Transwell de membranas de poro de 1 µm sendo adicionados aos compartimentos superior e

inferior meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Ambas plataformas de cultivo foram estudadas, cultivos em monocamadas (2D) geradas a partir de suspensão de células e esferoides 3D, já inseridos no compartimento superior formados; (B) Para padronização da capacidade da célula em atravessar o poro no Transwell as seguintes condições foram testadas (I) ambos compartimentos contendo DMEM sem adição de soro bovino fetal (SBF), (II) apenas o compartimento superior contendo SBF, (III) apenas o compartimento inferior contendo SBF e (IV) ambos compartimentos contendo SBF.

3.11.3. Estudos de Proliferação Celular, Apoptose e Necrose

Os estudos de proliferação celular foram realizados frente aos tratamentos, a fim de observar a influência dos mesmos na manutenção da proliferação das células tumorais. Foi utilizado anticorpo anti-ki67 (Alexa 647) para determinar a atividade proliferativa.

E os estudos de apoptose e necrose foram realizados com o intuito de determinar o mecanismo de morte que se instala após os tratamentos. Para tal, foram utilizados os marcadores Anexina V (FITC) e iodeto de propídio (1 mg/mL), marcadores para apoptose e necrose respectivamente.

Para ambos experimentos, 5×10^5 células por poço foram sub-cultivadas em placas de 24 poços e os tratamentos foram incubados por 24 horas. Após incubação, as células foram tripsinizadas e centrifugadas, juntamente com o sobrenadante, a 1800 rpm por 7 minutos. Para apoptose e necrose, adicionouse a Anexina V e o lodeto de propídio, ambos diluídos em 100 µL de PBS. Para proliferação, seguiu-se a fixação das células com uma solução a 4% (m/v) de paraformaldeído durante 15 minutos, seguida de centrifugação a 2000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Adicionou-se 1000 µL de álcool 70% (v/v) e as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C. Seguiu-se uma centrifugação a 2000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Por fim, o anticorpo anti-ki67 foi adicionado e incubado a temperatura ambiente, por 30 minutos antes da análise.

Todos os tubos foram protegidos da luz e a leitura foi realizada em citometria de fluxo (BD FACSCanto I, FlowJo).

3.12. Atividade antitumoral in vivo

Os estudos *in vivo* foram conduzidos de acordo com a Lei Arouca (nº 1794/2008) que estabelece os critérios para uso de animais em pesquisas
científicas. O número de animais do presente estudo foi determinado de acordo com a Equação de recursos, em consonância com a Resolução normativa nº 25 de setembro de 2015 do CONCEA.

O estudo da atividade antitumoral *in vivo* foi realizado utilizando um xenotransplante da linhagem celular A431 em camundongos *knockout* (NU(Ico)-Foxn1^{nu} – Laboratório Charles River) e encontra-se registrado no CEUA da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, n°19.1.718.60.2 (Anexo III).

Os animais foram adquiridos com 6-8 semanas, pesando aproximadamente 25 g e foram mantidos sobre condições de alojamento 3 animais/454 cm², contendo micro isolador, temperatura máxima de 22°C e mínima de 28°C, 26 trocas de ar/hora, controle de iluminação 12 horas claro/escuro, alimentação *ad libitum*.

3.12.1. Delineamento do estudo – Indução e tratamentos

As células A431 foram cultivadas até que alcançassem sua fase Log de crescimento, e 1 x 10^6 células (Viabilidade >90%) foram injetadas suspensas em 100 µL no dorso dos animais via subcutânea. Os animais foram pesados no momento da injeção das células e foram monitorados diariamente quanto ao aparecimento do tumor.

Cerca de 5 dias após injeção o tumor iniciou seu crescimento e foi monitorado até que atingisse 120±20 mm³ de volume (7 a 10 dias após injeção). Após alcançar este volume tumoral, iniciou-se o tratamento, diariamente, conforme Tabela 6, durante 15 dias. Todos os dias foi realizada medição tumoral com auxílio de um paquímetro e o peso dos animais também foi monitorado diariamente.

Grupo ovporimontal		Concentração dos ativos	5
Grupo experimental	5-FU	siRNA Bcl-2	N⁰ NPs
Controle	N.A	N.A	N.A
CLN controle	N.A	N.A	2 x10 ¹¹
5-FU (solução)	10 mg/ kg	N.A	N.A
siRNA Bcl-2 livre	N.A	1,5 mg/kg	N.A

Tabela 6. Especificações dos tratamentos aplicados diariamente em cada grupo experimental.

Creme comercial 5-FU	10 mg/ kg	N.A	N.A
CLN siRNA Bcl-2	N.A	1,5 mg/kg	2 x10 ¹¹
CLN 5-FU	10 mg/ kg	N.A	2 x10 ¹¹
CLN 5-FU + siRNA Bcl-2	10 mg/ kg	2 x10 ¹¹	1,5 mg/kg

Após decorridos 15 dias de tratamento os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica (Tiopental e lidocaína intraperitoneal, 100 mg/kg e 3 mg/kg respectivamente). O tumor e a pele sobre o mesmo foram excisados.

O tumor excisado foi pesado e medido e foi parte fixado em formaldeído (10%, v/v) em PBS por 48 horas, para análises histológicas e imunohistoquímicas, e parte congelado em -80°C para análises de mieloperoxidases (MPO), N-acetilglucosamina (NAG) e testes ELISA.

3.12.2. Avaliação da Redução tumoral

A redução do volume tumoral foi o primeiro parâmetro a ser avaliado após eutanásia dos animais. Os tumores foram medidos durante todos os dias do tratamento e o volume tumoral foi calculado baseado na Equação (7), onde o volume foi determinado baseado no menor diâmetro (d) e maior diâmetro (D) medidos transversalmente. Após eutanásia, antes de qualquer procedimento de fixação ou congelamento os tumores foram medidos para cálculo do volume final.

$$V(mm^{3}) = d^{2}x\frac{D}{2}$$
(7)

A análise da redução tumoral foi baseada na redução a partir do D1, considerando os três animais de cada grupo e suas medidas individuais durante os 15 dias de tratamento. Os dados foram apresentados em relação a mediana ± desvio padrão.

3.12.3. Determinação de mieloperoxidases (MPO)

A determinação de MPO em tumores são de extrema importância para correção da presença imune, neste caso de neutrófilos. A MPO é uma enzima lisossomal armazenada nos grânulos de neutrófilos e tem papel fundamental na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ZEINDLER et al., 2019). Desta forma pode-se relacionar altas porções de MPO com alta presença imune bem como com a geração de ERO.

Para determinação de MPO, pesou-se 100 mg de tecido tumoral e este foi triturado em 500 µL tampão fosfato de sódio EDTA pH 4,7 (0,1 M) em banho de gelo, e o conteúdo foi transferido para microtubos. O conteúdo triturado foi centrifugado a 2000 x g por 15 mim a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet formado foi ressuspenso em 200 µL de tampão fosfato de sódio EDTA pH 4,7 (0,1 M). O conteúdo foi agitado em vórtex e 200 µL de NaCl (0,2% m/v) foi adicionado e todo o conteúdo foi novamente centrifugado a 2000 x g por 15 mim a 4°C. Novamente o sobrenadante foi desprezado e o conteúdo foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio contendo H-TAB (0,1 M) pH 5,4 e agitada em vórtex. 3 ciclos de congelamento e descongelamento da amostra foi realizada em nitrogênio líquido. A amostra foi centrifugada a 10000 x g por 15 minutos a 4°C.

Protegido da luz, em uma placa de 96 poços adicionou-se 25 μ L das amostras, diluídas 1:5 em água ultrafiltrada, e a cada uma foram adicionados 25 μ L de TMB (n=3). Incluiu-se em cada poço 100 μ L de H₂O₂ (0,003 %, v/v) e incubar a 37°C durante 15 minutos. Adicionou-se a cada poço 75 μ L de H₂SO₄ (4 M) para interromper a reação e realizou-se a leitura em absorbância em leitora de microplacas BioStack Ready (Biotec Synergy 2, EUA) a 450 nm.

3.12.4. Determinação de N-acetilglucosamina (NAG)

A NAG é uma enzima produzida por macrófagos ativos, e a determinação desta enzima em tumores se correlaciona a presença imune e processos de fagocitose (ANGELOVA et al., 2015).

Para determinação de NAG, pesou-se 50 mg de tecido tumoral e este foi triturado em 500 μ L tampão fosfato de sódio EDTA pH 4,7 (0,1 M) em banho de gelo. Em uma placa de 96 poços adicionou-se 25 μ L das amostras, diluídas 1:5 em água ultrafiltrada, e a cada uma foram adicionados 25 μ L de solução de NAG (2,25 nM) e 100 μ L de tampão citrato (50 mM, pH 4,5). A placa foi incubada por 1 hora a 37°C. A reação foi interrompida por 100 μ L de tampão de glicina (200 mM, pH 10,4) e a leitura foi realizada em absorbância em leitora de microplacas BioStack Ready (Biotec Synergy 2, EUA) a 405 nm.

3.12.5. Estudos histológicos por Hematoxilina / Eosina (HE)

As amostras foram colocadas em cassetes histológicos e submersas em solução de formaldeído 10% em tampão fosfato (0,1 M) por 48 horas para

completa fixação. Para a inclusão de parafina, as amostras, primeiramente, passaram por sucessivas soluções para desidratação tecidual: 1 hora em cada álcool, sendo estes: 70%, 80%, 90% e 95%; seguido de uma mistura álcool-xilol (1:1) *overnight*; e após a mistura seguiu-se nos xilóis; xilol I, II e III, 1 hora em cada, seguidos da parafina à 60 °C por 2 horas.

Em seguida as amostras foram moldadas para serem cortadas no micrótomo, cortes estes, realizados a 5 µm de espessura. As lâminas foram colocadas em estufa a 60 °C por 2 horas para que toda a parafina se fundisse e escorresse dos cortes. Após este processo, os cortes passaram por processo de hidratação, iniciando nos xilóis: xilol I, II, III; mistura álcool-xilol (1:1), álcool absoluto I, II, álcool 95%, 70% e 50% por 2 minutos cada; seguido de um enxague durante 5 minutos em água corrente e dois enxágues instantâneos em água destilada.

As lâminas então foram inseridas em solução de hematoxilina por aproximadamente 5 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos, seguida de um enxágue em água destilada e um enxague em álcool 80%. Então, foram inseridas em solução de eosina por aproximadamente um minuto. Após coloração HE, as amostras passaram por processo de desidratação (contrário ao de hidratação) para que as lâminas fossem montadas em Entellan^{®.}

Os cortes histológicos foram analisados em um microscópio Leica DM 4000B (Leica, Microsystems[®], Alemanha), e as imagens foram adquiridas nos aumentos 5x, 10x, 20x, 40 x e 100x.

3.12.6. Estudos histológicos por Tunel

A determinação de apoptose nos tecidos foi realizada através do kit DeadEnd[™] Colorimetric TUNEL (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) seguindo o protocolo do fabricante.

Resumidamente, a amostra passou por processo de remoção da parafina seguida de reidratação, passou por fixação com paraformaldeído (4%, m/v) e então foi incubada com uma solução de proteinase k (20 µg/mL), e passou por processo de refixação com paraformaldeído (4%, m/v). Uma mistura da enzima rTdT e um mix de nucleotídeos foram adicionados a amostra e a amostra foi incubada por uma hora à 37°C. Após decorrida a incubação a amostra foi imersa por 15 minutos em solução de NaCI e citrato de sódio, então foi lavada em

75

tampão fosfato e incubada 5 minutos em H₂O₂ (0,3%, v/v). Após incubação, foi novamente lavada em tampão fosfato e adicionou-se 100 µL de Streptavidin HRP (1:500) e incubou-se por 30 minutos. As amostras foram novamente lavadas com PBS e incubadas com DAB até que coloração levemente marrom aparecesse. Após ocorrida a reação, as lâminas foram abundantemente lavadas em água deionizada. As amostras passaram por processo de desidratação para serem montadas em Entellan[®].

Os cortes histológicos foram analisados em um microscópio Leica DM 4000B (Leica, Microsystems[®], Alemanha), e as imagens foram adquiridas nos aumentos 5x, 10x, 20x, 40 x e 100x. Uma amostra independente, de amigdala, foi usada como controle positivo de apoptose.

3.12.7. Estudos histológicos por Tricômico de Masson

A determinação do conteúdo fibroso/ elástico foi realizada através do kit Tricrômio de Masson - Histokit (Easy Path) seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, as lâminas foram colocadas em estufa a 60 °C por 2 horas para que toda a parafina se fundisse e escorresse dos cortes. Em seguida, as lâminas foram embebidas em xilol por 5 minutos, seguida de uma hidratação em álcool 99°, 95°, 70° e por fim em água corrente. As lâminas foram lavadas água destilada e secas. Os cortes foram cobertos por 10 minutos com uma mistura dos reagentes A + B na seguinte proporção: 10 gotas do reagente A + 10 gotas do reagente B. Após decorrido 10 minutos as lâminas foram expostas a água corrente e novamente foram secas. Em seguida, por 6 minutos ficaram cobertas pelo reagente C. Foram então lavadas e os cortes foram cobertos por 10 gotas do reagente D, por 4 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente e e cobertas pelo reagente E e F em seguida, por 5 minutos cada. Os cortes foram desidratados e as lâminas foram montadas com Entellan[®].

Os cortes histológicos foram analisados em um microscópio Leica DM 4000B (Leica, Microsystems[®], Alemanha), e as imagens foram adquiridas nos aumentos 5x, 10x, 20x, 40 x e 100x.

3.12.8. Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA)

Todos os procedimentos do ensaio foram de acordo com o fabricante do teste ELISA Bcl-2 humano e TNF-α. Os reagentes, para ambos os testes foram preparados no momento do uso.

Inicialmente, preparou-se padrões para obtenção das curvas analíticas dos testes. As concentrações das curvas para Bcl-2 foram: 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1 e 0,5 ng/mL; e para TNF-α foram: 1000; 500; 250; 125; 65,5; 30 e 15 pg/mL.

Os ensaios foram realizados separadamente, porém utilizando as mesmas amostras, sendo 50 mg do tumor triturado em 500 μ L de água ultrapurificada, em banho de gelo. 250 μ L da amostra foi reservado para cada teste ELISA sendo essa diluída 1:10.

Para Bcl-2, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi ressuspenso em tampão de lise e incubou-se por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida o conteúdo foi centrifugado a 1000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi aliguotado. Os pocos da placa do kit foram lavados com tampão de lavagem e 20 µL da amostra (diluída 1:10) foi inserido por poço (n=3) e adicionou-se 80 µL de 1X tampão de ensaio e 50 µL de 1X anticorpo conjugado (biotin) por poço, e a placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com 1X tampão de lavagem e 100 µL de 1X Streptavidin-HRP foram adicionados aos poços, incluindo os controles, e a placa foi novamente incubada, desta vez por 1 hora. Os poços foram novamente lavados três vezes e a placa foi protegida da luz e em sequência 100 µL do substrato TMB foi adicionado por poço e após 10 minutos a reação foi interrompida com 100 µL de solução de parada. A leitura da placa foi realizada a 450 nm em uma leitora de microplacas BioStack Ready (Biotec Synergy 2, EUA).

Para TNF- α , 100 µL de amostra (diluída 1:10) foi inserida nos poços da placa do Kit, anteriormente bloqueados com 1X diluente de ensaio, e foram incubadas *overnight* a 4°C. Os poços foram lavados com PBS e adicionou-se o anticorpo, e então seguiu-se uma incubação de uma hora. Os poços foram em seguida lavados e neles adicionados 100 µL de Avidin- HRP e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Seguidos de lavagens com PBS, adicionou-

77

se 100 µL de solução de substrato por poço e realizou-se uma incubação de 15 minutos. A reação foi interrompida com 100 µL de solução de parada. A leitura da placa foi realizada a 450 nm em uma leitora de microplacas BioStack Ready (Biotec Synergy 2, EUA).

Resultados e Discussão

4.1. Quantificação do 5-FU por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Através da Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando método bioanalítico desenvolvido e validado em trabalhos anteriores (ROSA, 2019), foi possível a quantificação do 5-FU nas diversas condições deste trabalho sendo elas: conteúdo encapsulado; conteúdo liberado; conteúdo permeado, tampão e meio de cultura; e inserido nas camadas do tecido cutâneo.

O fármaco 5-FU apresentou tempo de retenção de aproximados 3 minutos, com alta resolução cromatográfica (Figura 8). Apresentou-se linear na faixa de concentração do estudo bem como atendeu aos quesitos de precisão e exatidão.



Figura 8: Dados obtidos por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do fármaco 5-FU após extraído do tecido cutâneo à (A) 0,5 μ g/mL, (B) 5 μ g/mL e (C) 20 μ g/mL bem como sua (D) linearidade na faixa de 0,1 à 20 μ g/mL e (E) análises de distribuição de resíduos.

Conforme descrito anteriormente (ROSA, 2019), para quantificação no tecido cutâneo, o mesmo passou por uma extração líquido-líquido com acetato de etila (SANSON et al., 2011) na qual foi eficiente em eliminar os possíveis interferentes no tempo de retenção do 5-FU, possibilitando sua quantificação confiável.

4.2. Estudos farmacotécnicos preliminares

A formulação do CLN proposto passou inicialmente por um rastreamento de tempo de homogeneização em Turrax bem como diferentes rotações (Figura 9-A), onde foi possível observar que a menor rotação, 12000 rpm, tem a capacidade de reduzir o diâmetro médio das partículas a partir do primeiro minuto e este diâmetro se mantém nos 5 minutos avaliados. A rotação mais alta, 20000 rpm, por sua vez, a redução do diâmetro médio ocorre gradativamente. Porém, quando ambas pré-emulsões, geradas em 5 minutos em 12000 e 20000 rpm, são inseridas no homogeneizador à 500 e 750 Bar, durante 40 minutos, elas são capazes de gerar diferentes padrões de nanopartículas no quesito diâmetro (Figura 9-B) e PdI (Figura 9-C).



Figura 9: Estudos farmacotécnicos preliminares do CLN: (A) rastreamento de tempo de preparo das pré emulsões a 12000 e 20000 rpm, (B) Diâmetro de partículas obtidas no rastreamento de pressão versus tempo para ambas pré emulsões preparadas durante 5 minutos, (C) PdI obtidos no rastreamento de pressão versus tempo para ambas pré emulsões preparadas durante 5 minutos, (D) Diâmetro de partículas obtidas no rastreamento de pressão versus tempo para ambas pré emulsões preparadas durante 5 minutos, (D) Diâmetro de partículas obtidas no rastreamento de pressão versus tempo para a pré emulsão preparada a 20000 rpm durante 5 minutos, (E) PdI obtidos no rastreamento de pressão versus tempo para a pré emulsão preparada a 20000 rpm durante 5 minutos, (E) PdI obtidos no rastreamento de pressão versus tempo para a pré emulsão preparada a 20000 rpm durante 5 minutos, (E) PdI obtidos no rastreamento de pressão versus tempo para a pré emulsão preparada a 20000 rpm durante 5 minutos, (E) PdI obtidos no rastreamento de pressão versus tempo para a pré emulsão preparada a 20000 rpm durante 5 minutos, (E) PdI obtidos no rastreamento de pressão versus tempo para a pré emulsão preparada a 20000 rpm durante 5 minutos, (E) PdI obtidos no rastreamento de pressão versus tempo para a pré emulsão preparada a 20000 rpm durante 5 minutos.

As pré-emulsões geradas a 12000 rpm entram no homogeneizador consideravelmente menores que aquelas geradas a 20000 rpm. Porém, as nanopartículas produzidas tanto em 500 e 750 Bar, a partir da pré-emulsão gerada em 20000 rpm, possuem PdIs que indicam menor polidispersão do sistema. A pré-emulsão gerada a 20000 rpm sob pressão de 500 Bar, foi capaz de gerar CLN com diâmetros ao redor de 250 nm, diâmetro este considerado ideal para o proposto trabalho.

Desta forma, a pré-emulsão à 20000 rpm foi inicialmente considerada apta a passar pelo rastreamento de diferentes pressões de homogeneização, sendo essas caracterizadas quanto aos seus diâmetros (Figura 9-D) e PdI (Figura 9-E). No que diz respeito ao diâmetro, as pressões 500 e 1000 Bar, geraram sistemas com pouca variação durante o tempo, porém somente a pressão de 500 Bar foi capaz de fornecer ao sistema um PdI adequado, pouco polidisperso. As demais condições de pressão avaliadas geraram durante o tempo coalescência do CLN, o que foi observado como uma alternância entre PdIs altos e baixos durante o tempo, principalmente para as maiores pressões.

Em homogeneização de alta pressão o processo de redução de tamanho das estruturas é um processo dinâmico que envolve diversos fatores, tais como o diâmetro inicial inserido, a taxa de ruptura, taxa de coalescência, fluxo do fluido, da válvula de pressão do equipamento bem como das interações interfaciais. O processo de cavitação é um dos mais importantes na redução do tamanho das estruturas, porém este processo, associado a rupturas e coalescência, também são responsáveis pela alta variação dos diâmetros obtidos no processo. Estudos reportam a relação das altas pressões com o aumento dos processos de coalescência relacionados a cavitação. Isso se deve ao aumento da taxa de ruptura e taxa de coalescência, gerada pela energia emitida ao sistema quando a pressão é aplicada. As estruturas se tornam instáveis e o processo de choque entre as partículas é aumentando conforme a pressão aumenta (HÅKANSSON, 2018).

Desta forma, pode-se sugerir que a pressão de 1500 Bar esteja elevando a taxa de ruptura bem como a coalescência, por isso, altos valores de PdI são observados.

De modo a compreender melhor a influência de todos os fatores críticos do processo na formação do CLN em Homogeneizador de alta pressão, o estudo

82

fracionado que incluiu valores extremos das variáveis (Tabela 7) permitiu que pontuações fossem feitas (Figura 10).

Estudos fatoriais fracionados são amplamente usados antes de estudos de otimização em modelos de superfície de resposta, em casos onde existem inúmeros fatores que podem influenciar. Desta forma, o uso de estudos fracionados permitem realizar um rastreamento efetivo entre as variáveis com poucas formulações (TAVARES LUIZ et al., 2021).

Pode-se observar que nos valores extremos não se formam CLNs adequados para o estudo, porém eles indicam aqueles fatores nos quais são capazes de influenciar nas respostas. Os fatores que mais influenciaram foram agitação e tempo de homogeneização, porém devido à influência da pressão de homogeneização estar sempre relacionada à pré emulsão inserida e este ser um importante fator relacionado à técnica de preparo, não se descartou essa variável. Apenas o tempo de agitação foi considerado indiferente na geração dos CLNs.

		Variáve	Variáveis dependentes (Respostas)			
Formulações	Agitação (rpm)	Tempo de agitação (min)	Pressão de homogeneização (Bar)	Tempo de homogeneização (min)	Tamanho (nm)	PDI
1	8000	10	1000	2	1535,00	0,734
2	8000	1	500	2	1302,00	0,688
3	30000	10	500	2	135,20	0,474
4	30000	10	1000	40	64,71	0,385
5	8000	1	1000	40	270,80	0,424
6	8000	10	500	40	613,30	0,664
7	30000	1	1000	40	110,20	0,593
8	30000	1	1000	2	632,40	0,624

Tabela 7. Resultados do Planejamento Fatorial Fracionado do CLN para as 8 formulações requeridas.



Figura 10. Gráficos de Pareto dos resultados do estudo Fatorial Fracionado 2⁴⁻¹ Resolução IV, onde os fatores críticos do processo foram observados de modo a compreender suas influências no diâmetro de partícula (A) e PdI (B). A-Agitação (rpm), B-Tempo de agitação, C-Pressão de Homogeneização (Bar), D-Tempo de homogeneização (min). Significância p<0,1.

4.3. Otimização da nanoestrutura utilizando a estratégia de Design of Experiments (DoE)

O Design Composto Central (DCC) foi utilizado na otimização do CLN proposto, levando em consideração as observações dos estudos preliminares. Desta forma avaliou-se a influência da agitação (rpm), pressão (Bar) e tempo de homogeneização (min) sob as respostas: diâmetro de partícula, PdI, potencial zeta e encapsulação do 5-FU. Os resultados do modelo constam na Tabela 8.

No que diz respeito ao diâmetro de partícula (Figura 11) pode-se sugerir que as combinações dos fatores tiveram o mesmo padrão de influência, ou seja, quanto maior foram, menores diâmetros foram obtidos. As três variáveis influenciaram no diâmetro, porém o tempo de homogeneização apresentou uma influência quadrática, o que indica que essa variável pode ser otimizada para obtenção de diâmetros de partícula desejados (Figura 15-A e 15-B).

A respeito do PdI (Figura 12), o mesmo padrão que se observou para diâmetro de partícula foi evidenciado, onde os três fatores foram relevantes da determinação do PdI (Figura 15-C) e quanto maiores fossem as variáveis menor foi o PdI obtido (Figura 15-D).

Tabela 8. Resultados do Composto Central do CLN para as 20 formulações
requeridas. X1 – Agitação (rpm), X2 – Pressão de homogeneização (Bar), X3 –
Tempo de homogeneização (minutos).

	Variáveis independentes			Variáveis dependentes (Repostas)			
Formulações	X1	X2	Х3	Tamanho	PDI	Potencial	%EE
				(nm)		zeta (mV)	
1	15000,0	329,55	24,50	722,20	0,588	51,2	64,12
2	15000,0	750,00	3,47	3,47 1352,00 0,908 48,3		48,3	35,75
3	20000,0	500,00	12,00	789,30	0,807	46,0	59,70
4	15000,0	750,00	24,50	325,90	0,559	49,0	75,22
5	15000,0	750,00	24,50	266,30	0,377	49,1	74,30
6	15000,0	750,00	24,50	305,50	0,419	45,5	75,93
7	10000,0	1000,00	37,00	227,10	0,342	45,2	84,46
8	15000,0	750,00	24,50	298,60	0,507	43,2	74,70
9	15000,0	750,00	24,50	324,10	0,563	32,0	75,24
10	20000,0	1000,00	37,00	92,16	0,190	49,0	56,98
11	6591,0	750,00	24,50	849,60	0,816	51,0	10,43
12	10000,0	500,00	37,00	556,80	0,711	52,4	87,56
13	23409,0	750,00	24,50	247,00	0,470	50,9	59,48
14	15000,0	1170,45	24,50	405,50	0,661	46,3	20,83
15	20000,0	500,00	37,00	410,40	0,378	46,1	88,46
16	15000,0	750,00	24,50	331,10	0,544	39,8	74,01
17	10000,0	500,00	12,00	954,70	0,861	39,6	11,07
18	20000,0	1000,00	12,00	288,60	0,539	47,0	59,68
19	10000,0	1000,00	12,00	353,50	0,563	49,1	58,23
20	15000,0	750,00	45,52	94,46	0,370	50,8	64,74



Figura 11. Plotagens 3D da resposta diâmetro de partícula sob influência dos fatores (A) Agitação (rpm) *versus* Tempo de homogeneização (min), (B) Agitação (rpm) *versus* Pressão de homogeneização (Bar) e (C) Pressão de homogeneização (Bar) *versus* Tempo de homogeneização (min).



Figura 12. Plotagens 3D da resposta índice de polidispersão sob influência dos fatores (A) Agitação (rpm) *versus* Tempo de homogeneização (min), (B) Agitação (rpm) *versus* Pressão de homogeneização (Bar) e (C) Pressão de homogeneização (Bar) *versus* Tempo de homogeneização (min).

Sobre o potencial zeta (Figura 13), os fatores não foram capazes de influenciar estatisticamente (Figura 15-E), porém observou-se uma tendência a valores extremos das variáveis sempre culminarem em potenciais zeta maiores, porém sempre positivos (Figura 15-F). Essa observação deve-se ao fato de, neste estudo fatorial, só foram incluídos fatores críticos do processo de preparo, e o maior influenciador do potencial zeta ser o lipídio catiônico, e este foi constante em todas as formulações do estudo.





No que diz respeito a encapsulação (Figura 14-E) por sua vez, o padrão contrário foi evidenciado, onde os extremos geraram menores encapsulações quando comparadas a valores medianos. A agitação se mostrou ser de extrema importância na encapsulação (Figura 15-G) e sua influência quadrática indica que este fator pode ser otimizado para obtenção de encapsulações desejadas.



Figura 14. Plotagens 3D da resposta encapsulação sob influência dos fatores (A) Agitação (rpm) versus Tempo de homogeneização (min), (B) Agitação (rpm) versus Pressão de homogeneização (Bar) e (C) Pressão de homogeneização (Bar) versus Tempo de homogeneização (min).

Essa intensa influência da agitação sob a encapsulação do fármaco é um resultado previsível no ponto de vista farmacotécnico, pois na formação da préemulsão é onde o fármaco se integra ao nanossistema. Sendo os processos seguintes, no homogeneizador de alta pressão, processos apenas de redução de diâmetro, não modificadores da encapsulação, na intensidade que a préemulsão pode exercer.



Figura 15. Sumário de resultados do Design Composto Central onde observase para as respostas: diâmetro de partícula, (A) o gráfico Pareto seguido do (B) gráfico de efeitos principais; índice de polidispersão, (C) o gráfico Pareto seguido do (D) gráfico de efeitos principais; potencial zeta, (E) o gráfico Pareto seguido do (F) gráfico de efeitos principais e encapsulação, (G) o gráfico Pareto seguido do (H) gráfico de efeitos principais. A- Agitação (rpm), B- Pressão de homogeneização (Bar), C- Tempo de homogeneização (min).

A otimização do sistema foi realizada de modo a se obter nanopartículas em torno de 250 nm, menores PdIs possíveis, maiores encapsulações, e o potencial zeta não foi otimizado. A desejabilidade da otimização ficou em aproximados 95% sendo determinados os fatores: Agitação máxima (~ 23500 rpm), pressão de homogeneização de 500 Bar e Tempo máximo de 45,5 minutos. Tabela 9 mostra os valores alvos teóricos e experimentais obtidos desta otimização bem como as equações polinomiais obtidas.

		Teórico)		Experimenta	l		
Respostas	Diâmetro (nm)	Pdl	Encapsulação (%)	Diâmetro (nm)	Pdl	Encapsulação (%)		
Resposids	264,6	$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	0,256±0,005	86,90±0,29				
	Diâmetro	3383 - (0.0866 X1 - 2.58 X2 -	65.6 X3 + 0.0000	02 X1 ² + 0.0008	66 X2 ² + 0.707 X3 ³		
	Diametro	+ 0.000011 X1X2- 0.00010 X1X3 + 0.0182 X2X3						
Fauscões	Pdl	1.850 -	0.000051 X1 - 0.0012	4 X2 - 0.0098 X3	+ 0.0000001 X1	² + 0.0000001 X2 ²		
Equações	i di	+ (0.000198 X3 ² + 0.0000	0001 X1X2 - 0.000	0001 X1X3 + 0.0	ExperimentalPdlEncapsulação (%) $0,256\pm0,005$ $86,90\pm0,29$ $2 X1^2 + 0.000866 X2^2 + 0.707 X3^3$ $3 + 0.0182 X2X3$ $0.0000001 X1^2 + 0.0000001 X2^2$ $01 X1X3 + 0.0000001 X2X3$ $0.0000001 X1^2 - 0.000107 X2^2$ $3 X1X3 - 0.00327 X2X3$		
	Encansulação	-322	2.0 + 0.02218 X1 + 0.3	36 X2 + 7.02 X3	- 0.0000001 X1 ²	- 0.000107 X2 ²		
Edugõõõ	Encapsulação	- 0.0252 X3 ² - 0.000008 X1X2- 0.000153 X1X3- 0.00327 X2X3						

Tabela 9. Dados da predição teórica e dados obtidos experimentalmente da otimização do CLN através do Design Composto Central.

A utilização de homogeneizador de alta pressão no preparo de CLNs e nanopartículas lipídicas em geral já é amplamente reportada na literatura visando diversas aplicações (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017; GU et al., 2021; GUPTA et al., 2017; HUANG et al., 2017; MAKONI; KASONGO; WALKER, 2019; REN et al., 2020; ROCHA et al., 2021; YOOZBASHI et al., 2021), inclusive o uso do mesmo está relacionado com o aumento da eficiência de encapsulação de moléculas hidrofílicas (KASONGO; MÜLLER; WALKER, 2012).

Amasya *et al.* (2019) desenvolveram um CLN contendo 5-FU em homogeneização de alta pressão, porém o foco do trabalho foi na composição do sistema, onde eles avaliaram as proporções lipídicas, quantidades de fármaco, diferenças entre lipídios, o uso ou não de co-lipídios. O CLN obtido pelos autores apresentou cerca de 205 nm com PdI de 0,279, e as porcentagens de encapsulações foram entre 40-60 % (AMASYA et al., 2019).

Outros CLNs também foram desenvolvidos por homogeneização de alta pressão; sendo desenvolvido em condições a quente, assim como neste presente trabalho (EH SUK et al., 2020; GU et al., 2021; GUPTA et al., 2017), utilizando também 500 Bar de pressão (GU et al., 2021) e sendo também

desenvolvido em condições a frio, porém, assim como neste trabalho, utilizando 500 Bar de pressão (DUONG et al., 2019).

O uso do homogeneizador de alta pressão, por se tratar de um equipamento complexo e com inúmeras variáveis intrínsecas, acaba se combinando com estratégias de estudos fatoriais. No caso do homogeneizador de alta pressão tanto a pressão como o tempo de homogeneização são parâmetros críticos do processo (PCP) de preparo de qualquer nanoestrutura. E por isso, esses parâmetros são constantemente investigados em modelos fatoriais, sejam eles de filtragem ou de superfície de resposta. Esses modelos auxiliam na compreensão dos efeitos dos parâmetros, denominados variáveis independentes, sob as respostas, denominadas variáveis dependentes (TAVARES LUIZ et al., 2021).

Porém, quando se trata das escolhas das variáveis a se estudar em modelos fatoriais, deve-se sempre correlaciona-las ao objetivo principal do trabalho proposto, deste modo em uma significativa maioria dos estudos fatoriais envolvendo nanoestruturas, independente das variáveis independentes, as variáveis dependentes incluem diâmetros de partícula, PdI, potencial zeta, encapsulação de moléculas (DURAKOVIC, 2017; LEE, 2019; POLITIS et al., 2017; TAVARES LUIZ et al., 2021; ZHANG; MAO, 2016).

Desta forma, pode-se apontar diversos CLNs reportados na literatura na qual as variáveis respostas incluíam diâmetro de partícula, PdI, encapsulação, potencial zeta, utilizando diversos modelos, sendo eles modelos de *screening* e modelos superfície de resposta (CARBONE et al., 2019; MANAGULI et al., 2019; PIMENTEL-MORAL et al., 2019; PINTO et al., 2019b; RAJPUT; BUTANI, 2019; ROCHA et al., 2021; SHEVALKAR; PAI; VAVIA, 2019; SHIMOJO et al., 2019; WAGHULE et al., 2019).

Entre as metodologias de superfície de resposta está o DCC, um modelo abrangente que permite otimizar respostas de forma eficiente, pois tem a capacidade de ampliar a faixa estudada utilizando os valores axiais (KHIDHIR; HAMADI, 2018). Por este motivo este foi o modelo escolhido do presente trabalho, e através dele foi possível determinar a agitação em um valor axial (extremo), bem como o tempo de homogeneização, e este achado não seria possível utilizando outro modelo. Os resultados do DCC do presente trabalho eram esperados, pois tanto a agitação como o tempo de homogeneização já haviam se mostrado influenciadores do diâmetro do CLN nos estudos preliminares, e acreditava-se que a pressão poderia influenciar, devido à quebra dos nanosistemas ocorrer, no homogeneizador de pressão, no compartimento onde a pressão é empregada. A relação das variáveis com o diâmetro e PdI também era esperada, principalmente diante do platô observado nos gráficos de efeitos principais (Figura 15) nos maiores valores de cada variável, o que deixa evidente que a redução do diâmetro e PdI foi de acordo com o aumento de cada variável, porém alcança um valor máximo, onde não há mais redução.

4.4. Estudos iniciais de escalonamento – Scaling up

Após otimizado, o CLN, preparado inicialmente para um volume final de 20 mL, passou por um estudo inicial de escalonamento para que o mesmo fosse preparado em maiores volumes, chegando a simular volumes de escalas pilotos industriais (Figura 16). Os parâmetros de otimização, agitação e pressão de homogeneização, obtidos através do DCC, foram mantidos e então observou-se o impacto desses parâmetros através do tempo, para cada volume de preparo. Com o intuito de manter as características do CLN as mais próximas possíveis do volume de preparo inicial (20 mL), cada volume de preparo teve seu tempo de homogeneização ajustado.

O volume de uma formulação afeta diretamente em quantas vezes o volume total passará pela câmara pressurizada, principalmente se tratando de um homogeneizador de alta pressão operando em modo contínuo. Consequentemente, o aumento do volume do CLN acarretaria em um aumento do tempo em que o mesmo demandaria do equipamento, para se apresentar com as mesmas características. Essa afirmação é observada quando se compara os volumes maiores, 150 e 200 mL, com os menores, 100 e 50 mL.

A redução de tamanho do CLN volume 50 mL (Figura 16-A) foi rápida, já em 15 minutos se apresentava em aproximadamente 400 nm, porém PdI alto, demonstrando estar polidispersa. Com o aumento do tempo, em 45 minutos, tempo preconizado para o volume de 20 mL, a faixa de tamanho já foi ideal, porém ainda demonstrando alta polidispersão, até que em 75 minutos foi possível obter o CLN na faixa de 250 nm com PdI abaixo de 0,3.



Figura 16. Estudos iniciais de escalonamento de produção do CLN a (A) 50mL, (B) 100 mL, (C) 150 mL e (D) 200 mL, a partir de uma pré emulsão obtida em 23000 rpm a 5 minutos em seguida adicionada a homogeneizador de alta pressão a 500 Bar.

Com o dobro do volume, 100 mL (Figura 16-B), a condição em 75 minutos se replicou, mas durante o tempo foi possível observar uma redução menos intensa do que para ao CLN em 50 mL. Para os maiores volumes, 150 (Figura 16-C) e 200 mL (Figura 16-D), a redução significativa de tamanho de partículas só foi observada a partir de 60 – 75 minutos, desta forma avaliou-se tempos maiores de homogeneização, alcançando a condição de CLN na faixa de 250 nm e PdI moderadamente polidisperso (entre 0,3 e 0,4) em 150 minutos.

Para que cada volume de preparo escalonado apresentasse tamanho de partícula nas mesmas faixas (250 nm) e PdI moderadamente polidisperso (entre 0,200 e 0,400), assumiu-se então, um tempo de homogeneização de 75 minutos para CLN com 50 e 100 mL de preparo e 150 minutos para CLN com 150 e 200 mL.

Em relação ao aspecto visual dos diversos volumes de preparo do CLN, o mesmo se manteve em todos os volumes, apresentando-se como uma dispersão branca de caráter leitosa com baixa viscosidade.

4.5. Caracterização físico-química do CLN

Após estudos de otimização e estudos iniciais de escalonamento, a caracterização físico química do CLN foi amplamente realizada através das análises de DLS, NTA, no que diz respeito ao diâmetro, dispersão, cargas e número de partículas; %EE e %DL no que diz respeito a encapsulação de 5-FU; no âmbito morfológico utilizando MET; bem como sua estabilidade foi determinada e por fim, foi também analisado no quesito térmico e espectroscópico por TGA, DSC e FTIR. A Tabela 10 sumariza as características determinadas do CLN em seus diversos volumes de preparo.

Podemos observar que após devidas adaptações, todos os volumes de preparo conseguiram alcançar as mesmas características do volume otimizado, (20 mL). Os diâmetros de partícula se apresentaram na faixa entre 200 e 250 nm, tamanho este considerado adequado para uso tópico, visto que nanopartículas com maiores diâmetros podem ficar retidas no estrato córneo, e partículas menores podem atravessar o tecido cutâneo de maneira facilitada utilizando caminhos preferenciais como folículos pilosos e glândulas (BAROLI, 2010; LÓPEZ-GARCÍA; GANEM-RONDERO, 2015; ROSA et al., 2018). Visto a aplicação tópica ser o objetivo do presente trabalho, o diâmetro de partícula na faixa encontrada permite liberar os ativos, 5-FU e ácidos nucleicos, nas camadas da pele, podendo então proporcionar uma ação localizada eficiente.

Além do diâmetro, o PdI e potencial zeta são importantes indicadores do quão os volumes de escalonamento conseguem mimetizar o volume otimizado. Particularmente, o potencial zeta é uma importante característica, pois é através dele que se pode inferir uma possível complexação eficiente ou não com siRNAs, visto que se deseja uma complexação entre os resíduos aniônicos dos ácidos nucleicos e os resíduos catiônicos dos grupamentos amino presentes nas cadeias do lipídio catiônico DOTAP. O quão catiônico o CLN for, há uma maior capacidade de carga de siRNA, sendo então essa proporção determinada pela razão N/P de complexação. Além disso, potenciais zeta encontrados acima de 30 mV em módulo, são considerados importantes na manutenção da estabilidade das dispersões, visto que estas nanoestruturas com cargas superficiais altas, irão se repelir constantemente, e efeitos de instabilização, como coalescência não dominarão (BHATTACHARJEE, 2016; SATO et al., 2018).

92

No que diz respeito ao nº de nanopartículas por mililitro, pode-se observar que o CLN, independente do volume de preparo, contendo ou não 5-FU, possuiu as mesmas características, neste caso apresentando cerca de 1x 10¹² nanopartículas por mililitro.

As eficiências de encapsulação (%EE) do 5-FU e sua porcentagem de *drug loading* (%DL) foram por volta de 80-90 % e 7-8% respectivamente, para todos os volumes de preparo. Estes resultados foram considerados promissores, visto que o 5-FU se trata de uma molécula hidrofílica, sendo encapsulada em um sistema lipofílico. Sugere-se que essa alta encapsulação possa estar associada ao uso da pré emulsão bem como a quebra do sistema ter sido realizada em homogeneização de alta pressão.

Sistemas nanoestruturados lipídicos são de composição hidrofóbica e o 5-FU se trata de uma molécula hidrofílica (Log P -0,89), desta forma encapsular essa molécula neste sistema nanoestruturado é um desafio farmacotécnico, bem como mantê-lo encapsulado durante o tempo (ROHIT; PAL, 2013). A metodologia de preparo deste CLN em estudos anteriores, utilizando sonicação, a %EE alcançada foi de 57% (ROSA, 2019). Atribui-se o aumento significativo da %EE e consequentemente de %DL à maneira com que as nanopartículas são formadas e também à forma com que elas têm seu tamanho reduzido.

Em processos de sonicação a quebra das partículas se dá majoritariamente por cavitação, onde há a formação de bolhas que se chocam de acordo com a energia fornecida; porém na Homogeneização de alta pressão, como dito anteriormente, além da cavitação existem processos de ruptura por pressão e coalescência que influenciam na forma com que as nanoestruturas se quebram (HÅKANSSON, 2018; LI et al., 2015; TZANAKIS et al., 2017).

Diversos trabalhos na literatura, através das décadas, buscam desenvolver técnicas para aumentar a eficiência de encapsulações de moléculas hidrofílicas em sistemas lipídicos (ADITYA et al., 2015; DELGADO-CHARRO et al., 1997; KASONGO; MÜLLER; WALKER, 2012; KÜCHLER et al., 2009; ROHIT; PAL, 2013). Acredita-se que o preparo de pré-emulsões em sistemas que projetem menores energias, como sistemas Turrax, possam auxiliar no aumento da encapsulação, pois o fármaco consegue se associar ao sistema, e como não há quebra excessiva do sistema disperso, este permanece associado. No homogeneizador de alta pressão por sua vez, quando a pré emulsão é inserida,

o sistema lipídico já está parcialmente sólido, e este passa por quebras, porém a influência na encapsulação não ocorre de forma tão significativa (YADAV, 2019). Esta observação foi constatada no planejamento experimental realizado, onde a Agitação do Turrax foi o fator que mais impactou na encapsulação de 5-FU.

No entanto, manter o 5-FU encapsulado em um sistema de natureza lipídica é desafiador, e através da Figura 17, pode-se inferir que ao avaliar a estabilidade acelerada deste sistema essa encapsulação não se mantém ao longo do tempo. As análises de estabilidade mostram que o tamanho de partícula, PdI e potencial zeta se mantém ao longo de 60 dias. Porém, a %EE e %DL não são mantidas através do tempo, a partir de 15 dias de análise já se observa decaimento, que vão se ampliando ao longo de 30 dias. Estes resultados de encapsulação eram esperados pois, estando associado ao sistema lipídico, esta não é a forma de maior estabilidade que o 5-FU se encontra, então este sai do sistema lipídico em condição passiva para a fase aquosa.

Diante de tal evento deparou-se com duas opções: (i) atuar com baixos tempos de prateleira do sistema e prepara-lo constantemente ou (ii) mantê-lo sem a fase aquosa (não disperso) e ressuspendê-lo no momento do uso. Para avaliar a possibilidade de trabalhar sem a fase aquosa, os estudos do sistema liofilizado foram realizados (Tabela 11).

Pode-se notar que as variações de tamanho e potencial zeta, após ressuspensão, não foram significativas quando comparadas com o CLN antes do processo de liofilização, porém o PdI aumentou de forma significativa (cerca de 0,1), e este aumento era esperado pois ao se secarem, as nanopartículas podem se agregar, e não necessariamente voltarem a ser o que eram após serem colocadas em suspensão novamente.

No entanto, quando atentamos aos valores de %EE e %DL, podemos observar que o processo de liofilização consegue manter o 5-FU associado ao CLN, de forma mais eficiente que o mesmo em suspensão. Após 30 dias de liofilização, o CLN em todos os volumes de preparo, manteve sua %EE entre 75 e 80%, perdendo apenas cerca de 50 µg de 5-FU que estava encapsulado antes do processo de liofilização.

Tabela 10. Caracterização do CLN em seus volumes de preparo no que diz respeito ao diâmetro de partícula, PdI, potencial zeta, concentração de partículas e encapsulação do 5-FU (n=5). Tukey's test, 95% de confiança. As respectivas letras sobrescritas indicam igualdade estatística.

Formulações	Tamanho de partícula (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	№ NP/mL	%EE	%DL
20 mL controle	231,6 ± 4,60 ª	0,251 ± 0,005 °	49,0 ± 0,5 ^g	9,46x10 ¹¹ ± 4,19x10 ^{10 h}	N.A	N.A
20 mL contendo 5-FU	221,8 ± 11,59 ^b	0,290 ± 0,040 ^d	43,2 ± 9,2 ^g	1,25x10 ¹² ± 3,46x10 ^{10 h}	86,90 ± 0,29 ⁱ	7,90 ± 0,03
50 mL controle	243,9 ± 8,96 ^b	0,313 ± 0,003 ^e	47,3 ± 4,1 ^g	1,01x10 ¹² ± 7,09x10 ^{10 h}	N.A	N.A
50 mL contendo 5-FU	203,3 ± 2,85 ª	0,250 ± 0,020 °	48,5 ± 1,2 ^g	1,13x10 ¹² ± 3,59x10 ^{10 h}	80,68 ± 1,36 ^j	7,33 ± 0,12 ^m
100 mL controle	258,5 ± 9,13 ^b	0,309 ± 0,032 ^e	43,4 ± 7,1 ^g	1,04x10 ¹² ± 4,58x10 ^{10 h}	N.A	N.A
100 mL contendo 5-FU	206,4 ± 4,40 ª	0,260 ± 0,030 °	52,3 ± 2,7 ^g	7,71x10 ¹¹ ± 2,01x10 ^{10 h}	80,80 ± 0,89 ^j	$7,35 \pm 0,08$ ^m
150 mL controle	242,1 ± 4,67 ^b	0,394 ± 0,006 ^f	41,8 ± 0,9 ^g	9,96x10 ¹¹ ± 2,43x10 ^{10 h}	N.A	N.A
150 mL contendo 5-FU	227,8 ± 22,94 ^b	0,370 ± 0,014 ^f	42,4 ± 2,8 g	9,86x10 ¹¹ ± 6,08x10 ^{10 h}	88,42 ± 0,15 ⁱ	8,04 ± 0,01
200 mL controle	243,4 ± 3,16 ^b	0,332 ± 0,036 ^e	45,9 ± 2,5 ^g	9,28x10 ¹¹ ± 1,83x10 ^{10 h}	N.A	N.A
200 mL contendo 5-FU	218,9 ± 6,71 ª	0,380 ± 0,0100 ^f	45,3 ± 0,9 ^g	9,77x10 ¹¹ ± 3,40x10 ^{10 h}	87,93 ± 0,06 ⁱ	7,99 ± 0,01

5-FU= 5-Fluorouracil, NP=nanopartículas, %EE=eficiência de encapsulação, %DL= drug loading.

Tabela 11. Características apresentadas pelo CLN, contendo ou não 5-FU em todos os volumes de preparo, após ser liofilizado e ressuspenso. Tukey's test, 95% de confiança. As respectivas letras sobrescritas indicam igualdade estatística.

Formulação	Tamanho (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	Concentração encapsulada (μg/mL)	%EE	%DL
20 mL	252,55 ± 14,63 ^a	0,421 ± 0,001 ^b	48,2 ± 0,6 °	404,16 ± 12,75 ^d	80,83 ± 2,55 ^e	7,35 ± 0,23 ^f
50 mL	250,10 ± 7,35 ^a	0,431 ± 0,028 ^b	41,2 ± 6,2 °	394,49 ± 9,11 ^d	78,89 ± 1,82 ^e	7,17 ± 0,179 ^f
100 mL	248,30 ± 23,76 ^a	0,388 ± 0,031 ^b	46,3 ± 5,3 °	390,93 ± 5,66 ^d	78,18 ± 1,13 ^e	7,11 ± 0,10 ^f
150 mL	267,40 ± 45,54 ª	0,466 ± 0,069 ^b	46,5 ± 2,2 °	384,29 ± 18,28 d	76,86 ± 3,66 ^e	6,98 ± 0,33 ^f
200 mL	264,35 ± 45,33 ^a	0,399 ± 0,012 ^b	44,4 ± 5,7 °	383,11 ± 6,04 ^d	76,62 ± 1,21 ^e	6,97 ± 0,11 ^f



Figura 17. Estudo de estabilidade durante 60 dias para o CLN controle e 30 dias para o CLN contendo 5-FU. Avaliou-se diâmetro de partícula (A), PdI (B), potencial zeta (C), %DL (D) e %EE (E), onde apenas o CLN 5-FU em 20 mL apresentou-se diferente dos demais no tamanho de partícula. Tukey's test, 95% de confiança.

O processo de liofilização é benéfico não apenas para manter o ativo encapsulado como também manter o 5-FU estável, pois o mesmo em solução, sofre oxidação rapidamente (GOVERNO et al., 2017), como também, os lipídios em suspensão sofrem oxidação (BERTON-CARABIN, 2014; YI et al., 2014). Deste modo, a liofilização dos CLN é uma medida preventiva de diversos problemas de estabilidade do produto.

A caracterização morfológica por sua vez foi obtida por microscopia de transmissão (MET) (Figura 18) e os resultados de diâmetro de partícula foram compatíveis com os resultados de DLS e NTA, e a morfologia observada foi condizente com a literatura (PIMENTEL-MORAL et al., 2019), onde o CLN se apresenta esférico em torno de 200 – 250 nm, corado com acetato de uranila de forma intensa, apresentando poucos aglomerados. Não se observou nenhuma diferença de diâmetro entre os CLNs sem as moléculas ativas e contendo-as.

Complementar a todas as caracterizações realizadas, as análises térmicas e espectrométricas são importantes para compreender o comportamento de nanopartículas ao se formarem. TGA e DSC nos permitem inferir se ao se formarem, as nanopartículas manteriam as características térmicas de seus componentes, como também permite observar degradações de componentes, reações entre eles, formação de novos compostos e/ou incompatibilidades. O uso de DSC e TGA é amplo no campo da nanotecnologia, principalmente pela facilidade de identificar problemas do processo de preparo, como por exemplo, identificar se há degradação por calor. Muitos sistemas nanopartículados, não só sistemas lipídicos, utilizam calor no processo de preparo das nanopartículas, e em alguns casos há degradação devido à temperatura. Uma importante técnica que detecta este tipo de degradação é o DSC associado ao TGA (CORCIONE; FRIGIONE, 2012; FESSAS et al., 2006).

Na Figura 19 estão apresentadas as curvas de DSC (Figura 19-A) e TGA (Figura 19-B) de todos os componentes do CLN, bem como as preparações dos volumes do escalonamento, contendo e não contendo 5-FU. A análise de TGA apontou o evento de degradação de todos os componentes da formulação acima de 300 °C, garantindo que as análises de DSC fossem realizadas até essa temperatura. No preparo do CLN utiliza-se temperatura, ao fundir os lipídios, e dentro do homogeneizador, chegando até cerca de, no máximo 80 °C. Assim, demonstrou-se por TGA que não houve degradação dos componentes ao formar as nanopartículas, em nenhum de seus volumes (Tabela 12).

De acordo com as curvas de DSC e TGA, com a ausência de picos endotérmicos/exotérmicos diferentes dos esperados, sugere-se que não houve formação de novos compostos ao formar os CLN, bem como não houve incompatibilidades nem degradação de compostos. De acordo com os dados expostos na Tabela 12, através do TGA e DSC podemos afirmar que ao se formarem, os CLN modificaram as propriedades térmicas dos seus componentes, principalmente do lipídio sólido, Precirol-ATO-5[®].

Analisado separadamente, o Precirol-ATO-5[®] em TGA apresentava degradação em aproximadamente 335° C e em DSC, este lipídio apresentava evento endotérmico em 51°C com Δ H de 143,54 J/g. Ao se formarem, os CLNs de todos os volumes de preparo com ou sem 5-FU, apresentaram evento endotérmico abaixo de 50 °C e Δ H menores que o lipídio sólido separadamente.

97



Figura 18. Imagens representativas de Microscopia eletrônica de transmissão (MET) do CLN controle (A), CLN contendo 5-FU (B) e CLN multifuncional, contendo 5-FU e siRNA (C). A barra azul nas imagens indica 500 nm.

Através desta redução de Δ H pode-se inferir que houve desestruturação da estrutura organizada do lipídio sólido, podendo, este fato, ter contribuído significativamente com a encapsulação do 5-FU no sistema. Quando se analisa os diversos volumes de preparo do CLN observa-se um mesmo padrão de degradação em TGA bem como o mesmo padrão dos eventos endotérmicos em DSC, além de Δ H próximos, sugerindo alta similaridade entre cada volume de preparo.

As análises de FTIR foram realizadas de modo a complementar as demais caracterizações químicas realizadas, em DSC e TGA. O intuito dessa análise é observar a natureza inter-atômica dos componentes do CLN, antes e depois do preparo. A técnica de IFTR é uma técnica espectroscópica vibracional considerada reprodutível, além de empregar uma quantidade muito baixa de amostra, o que possibilita a realização da mesma de maneira simples. Além disso, o IFTR fornece

informações ao nível molecular, que nos possibilitam entender a relação entre os componentes do CLN, e se houveram novos compostos formados, bem como o surgimento de incompatibilidades (BAKER et al., 2014; SHEN et al., 2016; TALARI et al., 2017).



Figura 19. Curvas das análises térmicas termogravimetria (TGA) (A) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) (B) e análise espectroscópica por Infravermelho (IFTR), de todos os componentes da formulação bem como seus volumes de preparo, contendo e não contendo 5-FU.

Através das análises de DSC e TGA foi possível concluir que não houve formação de novos componentes e não houve incompatibilidade entre os componentes da formulação, e FTIR confirma essa conclusão. Na Figura 19-C podemos observar que para o CLN em todos os volumes de preparo, contendo e não contendo 5-FU as mesmas bandas foram observadas, caracterizadas pelas bandas dos componentes da formulação.

Pode-se observar no espectro do 5-FU, o aparecimento de bandas características deste fármaco, como, em aproximadamente 3400 cm⁻¹, vibrações

de deformação axial características de aminas aromáticas, em associação à deformação angular em 2300 cm⁻¹ característica de ligação N-H. Ainda sobre o espectro do 5-FU, em 1250 cm⁻¹ há absorção associada à vibrações de estiramento C-F e em 810 cm-1 vibrações referentes à ligação C-H do grupamento FC=CH, absorções estas já anteriormente observadas (SHEN et al., 2016).

Tabela 12. Dados das análises térmicas dos componentes da formulação do CLN, as nanoestruturas e suas variações de volumes de preparo contendo e não contendo 5-FU por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). ND= não determinado.

Componente englicado	то	A	DSC		
componente analisado	Onset X (°C)	Onset Y (%)	ΔH (J/g)	Onset (°C)	
5-FU	317,84	86,62	173,71	282,81	
Precirol-ATO-5	335,61	94,90	143,54	51,61	
DOTAP	210,05	92,37	21,34	154,18	
Triglic. do ác. Cáprico/ Caprílico	325,95	95,28	ND	ND	
Poloxamer 188	372,88	89,30	111,25	52,17	
CLN 20 mL controle	319,58	89,79	97,54	48,91	
CLN 5-FU 20 mL	333,93	91,34	86,79	46,58	
CLN 50 mL controle	304,42	90,01	87,03	48,82	
CLN 5-FU 50 mL	333,37	90,90	113,47	48,34	
CLN 100 mL controle	333,42	89,27	98,40	48,09	
CLN 5-FU 100 mL	318,16	91,31	83,04	49,24	
CLN 150 mL controle	325,13	89,83	94,72	49,08	
CLN 5-FU 150 mL	350,76	91,23	99,15	47,45	
CLN 200 mL controle	266,01	96,08	85,41	48,20	
CLN 5-FU 200 mL	300,70	90,31	100,29	47,78	

Duas intensas bandas de absorção em 2960 – 2850 cm⁻¹ estão presentes no espectro do lipídio sólido, Precirol-ATO-5[®] (Palmitoestearato de glicerila), e estas são caraterísticas de ligações C-H alifáticos. Em 1750 cm⁻¹ há uma banda intensa referente à vibração de deformação axial de dupla ligação C=O de éster e essa mesma banda também foi observada no espectro do lipídio catiônico DOTAP, porém levemente deslocada. No espectro do DOTAP também existe a banda forte característica de aminas em aproximadamente 3000 cm⁻¹. Para o Poloxamer 188, assim como para o lipídio sólido, em 2850 cm⁻¹ há intensa banda de C-H alifático, e além desta banda, também há uma banda que o caracteriza muito bem, em 1150

cm⁻¹, referente à deformação angular de ligação C-O, presente em toda a estrutura do Poloxamer 188.

Todas essas bandas citadas para os componentes da formulação, foram observadas para o CLN controle e CLN 5-FU, sugerindo que não houve incompatibilidades, nem formação de novos compostos.

4.6. Complexação e Estabilidade do complexo

A investigação adequada da complexação, razão N/P adequada, bem como resíduos e/ou bandas de arraste após liberação do ácido nucleico, são de extrema importância para garantir a eficiência do silenciamento (SATO et al., 2018).

O evento da complexação, deve garantir a máxima neutralização das cargas, tanto do nanosistema como das moléculas de RNA, pois altos resíduos de cargas estão relacionados com efeitos tóxicos, com a eficiência do silenciamento e segurança do uso dos ácidos nucleicos. O uso de siRNAs em excessos está relacionado com efeitos adversos denominados efeitos *off-target* (ZHANG et al., 2018a) e a garantia de 100% da complexação já auxilia na redução destes efeitos.

Através da eletroforese em gel de agarose foi possível determinar a condição de dureza do gel adequada para as corridas eletroforéticas dos siRNAs, além de determinar a relação da concentração do siRNA com o brilho emitido através da revelação de suas bandas utilizando o revelador de ácidos nucleicos. Através da quantificação do brilho emitido foi possível compreender que acima de 5 µM não há uma relação linear entre a concentração e o brilho emitido em nenhuma condição de dureza do gel, nem em 1% (Figura 20-A), nem em 1,5% (Figura 20-B) e nem em 2% (Figura 20-C), demonstrando então que o brilho está relacionado majoritariamente com o revelador. Porém, para obter menores limites de detecção e brilho, a concentração do revelador de ácidos nucleicos foi mantida.

Determinou-se então a melhor condição para proceder a corrida eletroforética sendo a de 1,0% de agarose, devido à sensibilidade alcançada nas menores concentrações de siRNA, bem como melhor definição doas bandas fluorescentes, o que acarreta maior confiabilidade na quantificação. Desta forma a mesma curva analítica de siRNAs foram realizadas para os siRNAs específicos nessa condição de dureza do gel (Figura 21).



Figura 20. Curvas de detecção do siRNA scrambled (controle negativo) em diferentes durezas do gel de agarose sendo essas (A) 1 %, (B) 1,5 % e (C) 2 %. As curvas de siRNA foram de 1 a 10 μ M e a intensidade do brilho revelado em Transluminator foi quantificada utilizando o software ImageJ NIH.

Após determinação da condição definida o ensaio de complexação e descomplexação (estabilidade do complexo) foi realizado (Figura 22) e através dele pode-se inferir que o diluente, o CLN e a heparina não apresentam fluorescência que interfira no brilho do siRNA. Deste modo, os siRNAs livres (5 µM) foram utilizados como controle positivo de fluorescência e os mesmos foram adotados como normalizadores de brilho, sendo considerados 100%. Tanto o ensaio de complexação como de descomplexação foram utilizados 5 µM de siRNA controle e siRNAs específicos, porém em diferentes razões N/P com o DOTAP presente na nanopartícula.



Figura 21. Curvas de detecção dos siRNAs específicos (A) Bcl-2, (B) Gli-1 e (C) EGFR nas mesmas condições de corrida e dureza de gel. As curvas de siRNA foram de 1 a 10 μ M e a intensidade do brilho revelado em Transluminator foi quantificada utilizando o software ImageJ NIH.

Os resultados demonstraram que o CLN a partir da razão N/P 2 conseguiu complexar 100% o siRNA controle (5 µM). A razão N/P 2 representa cerca de 8,3 x10⁷ nanopartículas. Em contrapartida, 5 U.I de heparina foram capazes de descomplexar praticamente todo o siRNA controle em todas as razões N/P, sem o aparecimento de resíduos ou bandas de arraste, indicativos de degradação (TOFANI et al., 2018). Os siRNAs específicos por sua vez, apresentaram variações nas razões N/P de complexação e descomplexação. O siRNA Bcl-2 foi 100% complexado a partir da razão N/P 2, e descomplexado em todas as razões sem degradação. O siRNA Gli-1 e siRNA EGFR foram completamente complexados a partir da razão N/P 5 porém também foram totalmente descomplexados em todas as razões.

Estes resultados como um todo indicam que o CLN é capaz de complexar eficientemente os siRNAs, controle e específicos, além disso, é capaz de liberá-los facilmente em meio competitivo de forma íntegra. Pode-se inferir que ao liberar o siRNA, o mesmo será capaz de desempenhar sua função pois a ausência de resíduos ou de bandas de arraste são fortes indicativos de que não houve degradação do mesmo ao ser liberado (SATO et al., 2018; TOFANI et al., 2018).



Figura 22. Ensaio de complexação e descomplexação dos siRNAs (A) controle negativo, (B) Bcl-2, (C) Gli-1 e (D) EGFR, nas mesmas condições de corrida. A quantificação de brilho foi realizada pelo software ImageJ NIH.

4.7. Estudos de Liberação

Os ensaios de liberação do 5-FU a partir dos CLNs foram performados de modo a compreender o mecanismo envolvido na liberação deste ativo bem como associar esta liberação a modelos de cinéticas.

A liberação de fármacos é uma propriedade importante de um sistema terapêutico, constituindo um pré-requisito à absorção do agente terapêutico.

Atualmente existem cinéticas que auxiliam na interpretação do modo pelo qual o agente ativo é liberado, os modelos mais estudados são de primeira ordem e ordem zero, porém com o avanço dos sistemas de liberação, e a influência de outros parâmetros na liberação dos ativos, outros modelos ganharam espaço neste campo de estudo (MATHEMATICAL MODELS OF DRUG RELEASE, 2015).

A liberação do 5-FU a partir de cada volume de preparo do CLN foram avaliadas utilizando célula de difusão de Franz e os resultados estão expostos na Figura 23. Todos os volumes de preparo do CLN, contendo 500 µg/mL de 5-FU, apresentaram-se entre 60 e 70%, da dose aplicada, liberada em até 8 horas de experimento. Desta forma, é importante avaliar o quão a nanoestrutura consegue modular a liberação do ativo, ou se este é liberado de forma passiva sem interferência do sistema.

As cinéticas avaliadas (Tabela 13) foram de (i) ordem zero, modelo este que indica que o ativo libera-se em condição de passividade, fluxo constante, onde não dependente da matriz que se encontra; (ii) primeira ordem, modelo este que indica que o ativo é liberado somente de acordo sua concentração, sendo a matriz inerte à liberação; (iii) Higuchi, tal modelo indica uma liberação sustentada/controlada do ativo, onde a matriz influencia no processo de liberação, e a liberação se dá via difusão; e por fim (iv) Hixson–Crowell, um modelo que indica se o fármaco é liberado via difusão ou dissolução; Esse modelo de cinética está relacionada com o fato de que o processo de liberação está relacionado com a dissolução do ativo pela matriz não por difusão, onde o sistema se desfaz ao liberar o ativo (CRUZ et al., 2006; MATHEMATICAL MODELS OF DRUG RELEASE, 2015; SIEPMANN; PEPPAS, 2011).

As cinéticas de liberação apontaram que os CLNs se adequam a cinética do modelo Higuchi. A cinética de Higuchi admite que a concentração do ativo liberada é proporcional a raiz quadrada do tempo, tendo como base a Equação (8) simplificada abaixo, onde Q representa a quantidade de ativo liberada, $K_{\rm H}$ é a constante do modelo Higuchi e *t* representa a unidade de tempo.

$$Q = K_H \sqrt{t} \tag{8}$$



Figura 23. Estudo de liberação do 5-FU a partir do CLN em todos os volumes de preparo, durante 8 horas em Célula de difusão de Franz (n=5).

Uma das primeiras suposições que o modelo Higuchi permite é assumir que a concentração inicial da molécula encapsulada no sistema é muito maior do que a que justificaria um comportamento estacionário, ou seja, a molécula encapsulada têm tendência a sair do sistema via difusão passiva, porém, controlada pela matriz (MATHEMATICAL MODELS OF DRUG RELEASE, 2015; SIEPMANN; PEPPAS, 2011).

Desta forma, pode-se inferir que o CLN tem a capacidade de modular a liberar do 5-FU, porém sem impedir que o mesmo seja liberado, sugerindo uma liberação sustentada durante o tempo, sendo esta unidade de tempo, menor do que para moléculas hidrofóbicas, devido a afinidade do 5-FU pelo meio aquoso.

Modelos de Cinéticas	as Ordem zero		Primeira ordem Higuchi		Hixson–Cro		owell	
Formulação	Equação	R ²	Equação	R^2	Equação	R ²	Equação	R ²
CLN 20 mL	y = 56,829x - 92,886	0,9957	y = 0,3269x + 0,8273	0,9935	y = 271,48x - 410,99	0,9985	y = -0,4372x + 8,8312	0,9818
CLN 50 mL	y = 34,76x + 8,2364	0,9861	y = 0,1133x + 1,6555	0,9668	y = 188,39x - 227,19	0,9969	y = -0,265x + 8,011	0,9850
CLN 100 mL	y = 44,463x - 42,651	0,9783	y = 0,1526x + 1,3874	0,9706	y = 256,92x - 403,06	0,9908	y = -0,2168x + 8,0211	0,9511
CLN 150 mL	y = 41,878x - 30,097	0,9909	y = 0,127x + 1,5421	0,9507	y = 208,42x - 286,27	0,9995	y = -0,2308x + 8,0041	0,9732
CLN 200 mL	y = 45,385x - 33,307	0,9899	y = 0,1223x + 1,6024	0,9624	y = 212,77x - 279,36	0,9890	y = -0,2503x + 8,0022	0,9621

Tabela 13. Dados das cinéticas de liberação para todos os volumes de preparo do CLN contendo 0,5% (m/m) de 5-FU. Os CLNs foram avaliados quanto às cinéticas de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson–Crowell (n=5).
4.8. Estudos cutâneos

Os estudos de permeação e retenção cutânea fazem parte de um grupo de experimentos adotados na avaliação de produtos que objetivam a aplicação cutânea, seja para ação tópica ou transdérmica. Foi realizado o experimento em plataforma *in vitro*, utilizando Célula de difusão de Franz e em plataforma *ex vivo*, utilizando o modelo explante hOSEC.

Inicialmente o estudo de viabilidade tecidual (TCC) (Figura 24) foi realizado para avaliar se o tecido cutâneo teria sua viabilidade afetada pelos tratamentos aplicados durante o tempo. Nenhuma diferença estatística foi encontrada e desta forma infere-se que nenhum dos tratamentos, na concentração estudada, afeta o tecido em sua viabilidade.



Figura 24. Ensaio de viabilidade tecidual (TTC) para avaliação da influência da solução de 5-FU, CLN e CLN 5-FU em (A) 24 horas, (B) 5 dias, (C) 10 dias e (D) 15 dias. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos nos determinados tempos experimentais. Two-Way ANOVA, 95% de confiança.

A permeação indica a concentração do fármaco que extrapolou as camadas da pele até o conteúdo permeado, e este conteúdo permeado representaria a circulação sistêmica, visto que no presente estudo utilizou-se a pele humana contemplando todas as suas camadas. Em contrapartida a

retenção indica o fármaco retido, proveniente do nanossistema, em cada camada da pele.

Em plataforma *in vitro*, cerca de 150 µg/cm² do 5-FU ultrapassou a pele humana em toda extensão até o conteúdo permeado (Figura 25-A), representando pouco mais que 30% do total da dose aplicada topicamente (Figura 25-B). O estudo de retenção por sua vez indicou cerca de 120 µg/cm² retidos na pele (Figura 25-C) sendo esta concentração equivalente a mais de 20% do total da dose aplicada (Figura 25-D) topicamente. As camadas da pele, em 24 horas, apresentaram 5-FU em uma maior proporção na epiderme, seguida da derme e por último o estrato córneo. Através do tempo há uma nítida redução do conteúdo de 5-FU no estrato córneo que é inversamente proporcional ao conteúdo da epiderme e derme, indicando a cinética de absorção do fármaco de forma passiva.

Os resultados são compatíveis com estudos de permeação cutânea realizados em trabalhos que também objetivaram ação tópica. Além disso, apresentam-se promissores por não apresentarem concentrações elevadas de 5-FU no permeado, o que sugere uma possível redução de efeitos adversos sistêmicos (KISHI; PRICE, 2018; PETRILLI et al., 2018; PRAÇA et al., 2018; VIEGAS et al., 2020).

Porém, a limitação da experimentação *in vitro*, que devido a não preservação do tecido, não se pode exceder 24 horas de experimentos (LEITE et al., 2021; OECD GUIDELINE FOR THETESTING OF CHEMICALS: SKIN ABSORPTION IN VITRO METHOD, 2004), a avaliação *ex vivo* se faz complementar, de modo a se observar o comportamento do nanosistema no tecido por tempo prolongado. No entanto, o modelo *ex vivo* também apresenta limitação no que diz respeito a dosagem, por se tratar de um modelo estático baseado em um *punch* de 1 cm². Para que o conteúdo fique apenas no estrato córneo, mimetizando aplicação tópica, apenas uma pequena dose pode ser aplicada. Desta forma o experimento *ex vivo* não atua em dose infinita.

109



Figura 25. Estudos cutâneos *in vitro* realizados em célula de difusão de Franz utilizando pele humana da região abdominal. (A) Quantidade de 5-FU, proveniente do CLN, que permeou em 24 horas de estudo e sua relação em (B) porcentagem da dose aplicada, bem como (C) a retenção do 5-FU, proveniente do CLN, nas camadas da pele e sua respectiva (D) porcentagem em relação a dose aplicada. Análises estatísticas por Two-Way ANOVA, 95% de confiança, sendo 3 horas < 6 horas = 12 horas < 24 horas.

No modelo *ex vivo* pode-se observar que o conteúdo retido, ao longo dos 15 dias, é significativamente maior na epiderme do que no estrato córneo, e maior que na derme até o 12º dia. Sendo o conteúdo da epiderme igual à derme nos 13º, 14º e 15º dias experimentais (Figura 26-A). Em relação a dose aplicada, a partir do 5º dia observa-se retenções acima de 70%, decaindo apenas nos últimos 3 dias experimentais (Figura 26-B), sendo este resultado explicado pelo conteúdo encontrado no meio de cultura (Figura 26-C), que demonstra uma passagem gradativa através da pele, porém baixa (<25%) (Figura 26-D), ao longo de todo o tempo experimental.



Figura 26. Estudos cutâneos *ex vivo* realizados utilizando o modelo explante hOSEC onde a retenção do 5-FU proveniente do CLN foi avaliada em pele humana por 15 dias. (A) Retenção do 5-FU nas camadas da pele e sua relação em (B) porcentagem da dose aplicada, bem como a (C) quantidade de 5-FU que permeou passivamente o tecido até o meio de cultura e sua relação em (D) porcentagem da dose aplicada topicamente. Análises estatísticas realizadas por Two-Way ANOVA, 95% de confiança.

Ambas as plataformas, *in vitro* e *ex vivo*, são capazes de predizerem a capacidade do CLN de penetrar o estrato córneo da pele humana facilmente, permear através das camadas conseguindo liberar o 5-FU, e este permanecer com padrão de retenção majoritariamente na epiderme seguida da derme, onde apenas pequenas proporções ultrapassam o tecido.

Entretanto devido a diferenças experimentais os parâmetros de permeação (Tabela 14) de ambas as plataformas experimentais são diferentes entre si, sendo o fluxo na plataforma *ex vivo* maior, fato explicado por se tratar de pequena dosagem em relação à plataforma *in vitro*. O *lag time* por sua vez, está de acordo à dose aplicada, na plataforma *in vitro*, por se tratar de dose infinita, o *lag time* se estabelece mais cedo, na plataforma *ex vivo* ele é maior, por se tratar de doses menores. O coeficiente de permeação (Kp) segue este mesmo raciocínio, sendo maior na plataforma de maior dose disponível.

No que diz respeito aos parâmetros dermatocinéticos, embora haja diferenças experimentais entre as plataformas, o padrão de retenção cutâneo apresentado é similar, sendo maior a concentração de 5-FU na epiderme seguida da derme e por fim no estrato córneo. As diferenças entre as plataformas se dão apenas no tempo máximo (T_{max}) para se alcançar as concentrações máximas (C_{max}), novamente devido à concentração aplicada topicamente em cada plataforma bem como tempo experimental.

Através das análises histológicas do tecido durante a exposição à nanoestrutura (Figura 27) é possível notar que em comparação ao grupo controle, o CLN não causa desestruturação nem desorganização tecidual. Em contraste pode-se observar o 5-FU em solução, que desde 24 horas de aplicação causa extrema desorganização tecidual, aumento da espessura da epiderme, descamação de células viáveis e aspecto vacuolado nas células da epiderme e derme.

Diferentemente de todos os grupos, o CLN controle por sua vez impede a descamação do estrato córneo, mantendo o tecido cutâneo mais estruturado ao longo do tempo. Esta observação se deve a formação do filme lipídico que o nanosistema proporciona ao ser aplicado topicamente, achado este já reportado na literatura (ROSA, 2019).

Controle



Figura 27. Imagens histológicas representativas do estudo ex vivo utilizando modelo explante hOSEC para observar o comportamento do CLN multifuncional desenvolvido no tecido cutâneo. A aplicação tópica foi realizada durante 15 dias consecultivos, e o 5-FU em solução bem como CLN controle foram utilizados como controle experimental. O grupo controle recebeu topicamente apenas tampão fosfato pH 7,4. As imagens foram obtidas em aumento 40x e barra nas imagens indica 50 µm.

Tabela 14. Parâmetros de permeação e retenção farmacocinéticos do 5-FU proveniente do CLN, aplicado em pele humana topicamente em condições de experimento *in vitro* e *ex vivo*. Dados apresentados como media ± desvio padrão. O experimento *in vitro* teve duração de 24 horas e o experimento *ex vivo* teve duração de 15 dias (360 horas).

Condição	Parâmetros de Permeação					Parâmetros dermatocinéticos								
	Quantidada	dade Volume FU aplicado) (μL)							Cam	adas da pel	e			
	de 5-FU (µg)		Fluxo	Lag	Kn (cm/h)	Est	Estrato córneo		Epiderme			Derme		
			(µg/cm²/h) time (h)			AUC	C _{max}	T _{max}	AUC	C _{max}	T _{max}	AUC	C _{max}	T _{max}
						(µg/cm²)	(µg/cm²)	(h)	(µg/cm²)	(µg/cm²)	(h)	(µg/cm²)	(µg/cm²)	(h)
In vitro	500	1000 (dose	0.15 + 0.01	0,13 ±	9,43 x10 ⁻⁴ ±	51,03 ±	24,17±	,17± ,87 3	142,40 ±	61,31 ±	24	83,79 ±	45,03 ±	24
		única)	$0,15 \pm 0,01$	0,01	9,1 x10 ⁴	1,09	1,87		1,53	0,50		2,27	3,25	
Exvivo	75 (5 / dia)		17 21 + 2 70	28,19 ±	1 15 . 0 15	17,27 ±	3,89 ±	169	259,40 ±	26,98 ±	160	106,60 ±	18,99 ±	226
EX VIVO		75 (57 dia)	iu / ula	$17,31 \pm 3,70$	4,29	$1,15 \pm 0,15$	0,49	0,44	100	7,94	3,37	100	4,34	2,45

Kp: Coeficiente de permeção; AUC: Área sobre a curva; C_{max}: concentração máxima; T_{max}: Tempo máximo.

4.9. Estudos celulares

4.9.1. Determinação da cinética de crescimento celular e tempo de duplicação (*Doubling time*)

O tempo de duplicação das linhagens foi determinado e através da Figura 28 pode-se notar os diferentes comportamentos de crescimento e proliferação celular entre as linhagens, bem como a permanência em cada fase de crescimento. A linhagem de queratinócitos normais (HaCaT) tem sua fase Lag prolongada e uma fase Log não acentuada, diferentemente das linhagens tumorais que possuem uma rápida fase Lag e uma fase Log inclinada. Somente na linhagem tumoral 1205Lu não foi possível observar a fase de morte celular, nas demais a fase de morte celular ocorreu a partir de 120 horas para A375 e 144 horas para A431 e Sk-mel-103.



Figura 28. Cinética de crescimento e duplicação celular das linhagens celulares tumorais de câncer de pele e linhagem de queratinócitos normais, durante 7 dias de cultivo.

O estudo de *Doubling time* nos permite identificar e compreender o crescimento da linhagem celular de modo a trabalhar nos experimentos *in vitro* em sua fase Log de crescimento.

4.9.2. Estudos de Viabilidade Celular em cultivo bidimensional (2D)

A avaliação da influência dos tratamentos na viabilidade celular é uma importante plataforma de triagem e são considerados testes pré-clínicos. Estes estudos devem prever a eficácia que antecedem estudos *in vitro* elaborados, tais como estudos de knockdown, eficácia *in vitro*, bem como estudos *in vivo* e ensaios clínicos.

Ensaios de viabilidade celular que avaliam simultaneamente a massa celular e atividade metabólica na mesma amostra, podem ser consideradas ferramentas importantes para prever uma futura toxicidade humana e para detectar doses limites de determinadas moléculas ou produtos. O método utilizado foi o teste de redução da resazurina, que foi desenvolvido nos anos 50 para avaliar a contaminação por bactérias ou leveduras em fluidos biológicos e leite. Neste ensaio, as células viáveis são capazes de reduzir a resazurina, um composto azul não fluorescente, a resofurina, um composto rosa fluorescente. Desta forma a quantificação da fluorescência está relacionada com a viabilidade celular. As principais desvantagens deste método são possíveis interferências fluorescentes de compostos testados e toxicidade intrínseca da resazurina para determinados tipos de células (TRAVNICKOVA et al., 2019).

Inicialmente realizou-se a avaliação da influência dos tratamentos na viabilidade da linhagem HaCaT. Nesta linhagem foi possível observar (Figura 29) que o CLN controle, bem como contendo siRNAs individualmente, em duplas ou em *pool*, apresentaram discreta alteração da viabilidade celular, porém não foram estatisticamente diferentes entre si.

A solução de 5-FU por sua vez, apenas acima de 500 µM apresentou influência na viabilidade celular, no entanto, quando este fármaco foi encapsulado no CLN, acima de 5 µM, já se observa alteração da viabilidade. Entretanto, as combinações do CLN 5-FU com os siRNAs individuais, em duplas ou *pool*, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na viabilidade em relação ao CLN 5-FU.

Após a linhagem não tumoral, as linhagens tumorais foram estudadas contemplando os mesmos tratamentos e pode-se observar que as linhagens tumorais mais sensíveis ao CLN contendo o *pool* de siRNAs e CLN 5-FU contendo o *pool* de siRNAs foram as linhagens A431 e 1205Lu. Porém, para

essas duas linhagens, somente a associação do CLN 5-FU com o siRNA Bcl-2 já acarretava em significativas reduções das viabilidades celulares.



Figura 29. Estudo de viabilidade celular em cultura bidimensional (2D) da linhagem HaCaT, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o *pool*, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos. (n=8).

Essa combinação do 5-FU com o siRNA Bcl-2 é claramente a combinação que mais afetou a viabilidade da linhagem A431 (Figura 30) podendo-se atribuir a alteração da viabilidade quando se utilizou CLN 5-FU + *pool* siRNAs, a esta combinação, e não aos demais siRNAs, Gli-1 e EGFR.

Para a linhagem A375 (Figura 31) a combinação de 5-FU encapsulado com as duplas de siRNAs Bcl-2 + Gli-1 ou Bcl-2 + EGFR, foram as combinações de maiores reduções da viabilidade celular, não sendo necessária a utilização do *pool*, pois o uso de somente uma das duplas mensionadas acima já impactaram igualmente ao *pool*. No entanto, para essa linhagem destaca-se

novamente a combinação do 5-FU com o siRNA Bcl-2 como uma combinação de importante ação sinérgica.



Figura 30. Estudo de viabilidade celular em cultura bidimensional (2D) da linhagem A431, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o *pool*, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos. (n=8).

A linhagem Sk-mel-103 (Figura 32) teve sua viabilidade principalmente afetada por muitas combinações, porém destaca-se a combinação do CLN 5-FU combinado com a dupla de siRNAs Gli-1 e EGFR, CLN 5-FU com o siRNA EGFR e siRNA Gli-1 sozinhos.

Por fim, a linhagem 1205Lu (Figura 33) destaca-se sua alta sensibilidade ao siRNAs específicos em geral, porém a combinação dos siRNAs com o 5-FU encapsulado apresentam potencial na redução da viabilidade. Destacam-se as combinações CLN 5-FU + siRNAs Bcl-2 e Gli-1 e CLN 5-FU + *pool* siRNAs como àquelas que demonstraram maior potencial na redução da viabilidade desta linhagem.



Figura 31. Estudo de viabilidade celular em cultura bidimensional (2D) da linhagem A375, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o *pool*, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos. (n=8).

A Tabela 15 sumariza os IC₅₀ calculados com base nos estudos de viabilidade bidimensionais, e os dados estão expressos em concentração, seja do 5-FU e siRNAs, quando aplicáveis e também números de nanopartículas, obtidos do cálculo do volume utilizado a partir dos dados de NTA.

A alta sensibilidade das linhagens celulares de melanoma ao siRNA Bcl-2 eram esperadas, devido à alta superexpressão dessa família de proteínas nessas linhagens. A família Bcl-2 como um todo representam importantes alvos no que diz respeito ao controle, indução e supressão dos eventos apoptóticos em tumores. Porém, já é conhecido que no câncer de pele melanoma, a proteína Bcl-2 é protagonista da inibição da apoptose, e está relacionada com a sustentação do tumor, crescimentos, e até mesmo com capacidade metastática (BASU, 2021; EBERLE; HOSSINI, 2008; KRISHNA et al., 2021; TRISCIUOGLIO; DEL BUFALO, 2021).



Figura 32. Estudo de viabilidade celular em cultura bidimensional (2D) da linhagem Sk-mel-103, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o *pool*, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos. (n=8).

Desta forma inúmeros trabalhos visam a inibição da tradução dos membros antiapoptóticos dessa família de proteínas, e o uso de nanopartículas em geral, carreando siRNA específicos, tais como MCL-1, Bcl-2, Bcl-xI (DUAN et al., 2018; LEE et al., 2019; PAN et al., 2018; QIAO et al., 2021; RESNIER et al., 2017; WU et al., 2019; YU et al., 2018). Estes membros que impedem os eventos apoptóticos, quando inibidos ou reduzidos a níveis basais, estão relacionados a estratégias de mover o melanoma ao caminho apoptótico.

A sensibilização por siRNA específico para Gli-1 e EGFR, eram inicialmente esperadas para a linhagem de câncer de pele não melanoma, A431, pois já foi elucidada a interação entre essas moléculas e o desenvolvimento e sobrevivência deste tipo de câncer (ALVES-FERNANDES et al., 2016; CASAS et al., 2017; ONO; KUWANO, 2006), porém os resultados aqui obtidos estão de acordo com dados encontrados na literatura, que relacionam EGFR e moléculas

do glioma (Gli-1 e Gli-2) com a sobrevivência secundária de melanomas, estando principalmente relacionadas a mecanismos de escapes da ação de fármacos, bem como aumento de eventos metastáticos (GROSS et al., 2014; MANZANO et al., 2016).



Figura 33. Estudo de viabilidade celular em cultura bidimensional (2D) da linhagem 1205Lu, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o *pool*, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos. (n=8).

A relação da ação do 5-FU com a inibição da tradução das moléculas Bcl-2, Gli-1 e EGFR demonstraram efeitos sinérgicos importantes para algumas linhagens, ficando clara a necessidade da associação completa, ou seja, 5-FU + *pool* siRNA. Para a linhagem 1205Lu, associações mais completas viram-se necessárias, enquanto que em alguns casos, associações menos agressivas já supririam o objetivo, como para as linhagens A431 e A375. Desta forma, o modo com que as células tumorais foram afetadas pela inibição das traduções das moléculas Bcl-2, Gli-2 e EGFR se mostraram promissoras para seguirem sendo avaliadas em plataformas *in vitro* mais complexas.

Tratamentos / Linhagens	5	A431	A375	Skmel-103	1205 Lu	HaCaT
	Nº NPs	1,84 x10 ¹⁰	1,85 x10 ¹⁰	1,55 x10 ¹⁰	1,18 x10 ¹⁰	1,73 x10 ¹⁰
CEN controle	Concentração	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
	Nº NPs	1,24 x10 ⁸	1,01 x10 ⁸	1,47 x10 ⁸	1,54 x10 ⁸	1,93 x10 ⁸
CLN 5-F0	Concentração	19,13 µM	15,47 µM	22,55 µM	23,74 µM	29,68 µM
	Nº NPs	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
5-ro solução	Concentração	83,92 µM	388,10 µM	785,9 μM	251,30 µM	334,90 µM
	Nº NPs	1,14 x10 ¹⁰	1,10 x10 ¹⁰	4,35 x10 ⁹	1,13 x10 ¹⁰	2,55 x10 ¹⁰
CLN SIRINA DCL-2	Concentração	5,69 nM	5,48 nM	2,18 nM	5,64 nM	12,75 nM
	Nº NPs	6,91 x10 ⁹	1,72 x10 ¹⁰	6,64 x10 ⁹	6,91 x10 ⁹	5,13 x10 ¹⁰
CLN SIRNA GII-1	Concentração	3,45 nM	8,59 nM	3,32 nM	3,45 nM	25,66 nM
	Nº NPs	4,10 x10 ⁹	1,78 x10 ¹⁰	5,54 x10 ⁹	9,15 x10 ⁹	4,27 x10 ¹⁰
	Concentração	2,05 nM	8,90 nM	2,77 nM	4,58 nM	21,37 nM
CLN siPNA scramblod	Nº NPs	1,23 x10 ¹⁰	1,90 x10 ¹⁰	2,31 x10 ¹⁰	8,12 x10 ⁹	2,54 x10 ¹⁰
CLIN SIRINA SCIAINDIEU	Concentração	6,16 nM	9,55 nM	11,55 nM	4,06 nM	12,69 nM
	Nº NPs	1,18 x10 ¹⁰	8,57 x10 ⁹	3,79 x10 ⁹	7,99 x10 ⁹	3,41 x10 ¹⁰
	Concentração	5,88 nM	4,29 nM	1,89 nM	3,99 nM	17,07 nM
	Nº NPs	7,87 x10 ⁹	1,01 x10 ¹⁰	3,61 x10 ⁹	9,29 x10 ⁹	2,94 x10 ¹⁰
CLN SIDCL-2 + SILGI N	Concentração	3,94 nM	5,03 nM	1,81 nM	4,65 nM	14,71 nM
	Nº NPs	5,55 x10 ⁹	1,47 x10 ¹⁰	5,29 x10 ⁹	8,72 x10 ⁹	4,71 x10 ¹⁰
CLN SIEGFR + SIGII-1	Concentração	2,77 nM	7,35 nM	2,65 nM	4,36 nM	23,56 nM
CLN pool siPNAs (Pol 2 · Cli 2 · ECEP)	Nº NPs	1,99 x10 ⁹	2,93 x10 ⁹	2,17 x10 ⁹	5,63 x10 ⁹	3,62 x10 ¹⁰
OLN POUL SINNAS (BUIZ + BIIZ + EGFR)	Concentração	0,99 nM	1,47 nM	1,09 nM	2,81 nM	18,13 nM

 Tabela 15. IC₅₀ obtidos nos estudos de viabilidade bidimensionais (2D), confiança 95%. si - siRNA; scrambled – aleatório (Random).

Continuação Tabela 15.

	Nº NPs	5,31 x10 ⁷	7,6 x10 ⁷	4,16 x10 ⁷	2,95 x10 ⁸	1,24 x10 ⁸	
CLN 5-FU + siBCL-2	Concontração	8,17 µM / 0,83	11,70 µM / 1,05	6,4 µM / 0,64	45,33 µM / 3,62	19,06 µM / 1,72	
	Concentração	nM	nM	nM	nM	nM	
	Nº NPs	2,31 x10 ⁸	4,58 x10 ⁸	1,23 x10 ⁸	1,41 x10 ⁸	2,11 x10 ⁸	
CLN 5-FU + siGli-1	Concentração	35,47 µM / 2,75	70,39 µM / 4,66	18,89 µM / 1,73	21,62 µM / 1,86	32,49 µM / 2,57	
	Concentração	nM	nM	nM	nM	nM	
	Nº NPs	1,18 x10 ⁸	2,29 x10 ⁸	1,35 x10 ⁸	1,07 x10 ⁸	2,43 x10 ⁸	
CLN 5-FU + siEGFR	Concontração	18,09 µM / 1,64	35,19 µM / 2,87	20,85 µM / 2,04	16,44 µM / 1,51	37,45 µM / 2,85	
	Concentração	nM	nM	nM	nM	nM	
	Nº NPs	5,33 x10 ⁷	7,9 x10 ⁷	5,12 x10 ⁷	1,62 x10 ⁸	1,31 x10 ⁸	
CLN 5-FU + siBCL-2 + siGli-1	Concontração	8,21 µM / 0,83	12,09 µM / 1,09	7,88 µM / 0,77	24,98 µM / 2,05	20,15 µM / 1,79	
	Concentração	nM	nM	nM	nM	nM	
	Nº NPs	5,39 x10 ⁷	1,32 x10 ⁸	9,26 x10 ⁷	1,72 x10 ⁸	1,37 x10 ⁸	
CLN 5-FU + siBCL-2 + siEGFR	Concontração	8,29 µM / 0,84	20,30 µM / 1,72	14,26 µM / 1,41	26,40 µM / 2,23	20,86 µM / 1,77	
	nM		nM	nM	nM	nM	
	Nº NPs	1,83 x10 ⁸	2,46 x10 ⁸	1,12 x10 ⁸	6,63 x10 ⁷	1,49 x10 ⁸	
CLN 5-FU + siGli-1 + siEGFR	Concentração	28,17 µM / 2,37	37,77 µM / 3,07	17,28 µM / 1,74	10,20 µM / 0,95	22,95 µM / 1,95	
	Concentração	nM	nM	nM	nM	nM	
CIN 5-FUL+ pool siRNAs (Bcl-2+Gli-2+	Nº NPs	4,70 x10 ⁷	9,80 x10 ⁷	3,37 x10 ⁷	1,28 x10 ⁸	1,05 x10 ⁸	
	Concentração	7,23 µM / 0,74	15,08 µM / 1,33	5,195 µM / 0,50	19,73 µM / 1,60	16,29 µM / 1,47	
2017)	Concentração	nM	nM	nM	nM	nM	

4.9.3. Desenvolvimento e padronização dos esferoides tridimensionais (3D)

Após completa avaliação da formação dos esferoides 3D durante os dias, bem como avaliação da esfericidade e circunferência de cada uma das linhagens, foi possível determinar a condição de trabalho de cada um, objetivando diâmetros em torno de 300 µm², esfericidade e circunferência o mais próximas a 1 possíveis.

O acompanhamento ao longo dos 7 dias de formação possibilitou a determinação adequada do crescimento, compressão e arredondamento de cada esferoide, e pode-se observar na Figura 34, que os esferoides de cada linhagem apresentam diferentes características de formação e desenvolvimento.

O esferoide da linhagem A431 (Figura 34-A) foi o mais compacto e bem formado desde o início, o esferoide da linhagem A375 (Figura 34-B) com aspecto frouxo nos primeiros 3 dias, tornando-se compacto após o 4º dia, o esferoide da linhagem Sk-mel-103 (Figura 34-C) de aspecto frouxo na superfície e compacto no interior, tornando-se compacto a partir do 4º dia, e por fim o esferoide obtido da linhagem 1205Lu (Figura 34-D), considerado de difícil formação espontânea, tornando-se compacto apenas a partir do 5º dia.

No que diz respeito aos parâmetros: diâmetro, circunferência e arredondamento, para linhagem A431 (Figura 35) quaisquer densidades celulares acima de 5000, se mostraram adequadas para o uso. Estes esferoides 3D desde 24 horas se formam compactos, com arredondamentos e circunferência próximos a 1. Observou-se nessa linhagem celular um aspecto interessante de compactação durante o tempo, deste modo, o esferoide não cresceu com o tempo, e apresentou centro tumoral visivelmente compacto até o 7º dia. Para 20000 células em 24 horas, o esferoide 3D apresentou 266,33 \pm 18,81 μ m² de diâmetro, circunferência de 0.90 ± 0.01 e arredondamento de 0.95 ± 0.02 .

124



Figura 34. Desenvolvimento e padronização de esferoides 3D das linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu, durante 7 dias em diferentes densidades celulares.



Figura 35. Caracterização dos esferoides 3D da linhagem A431 nos parâmetros diâmetro, arredondamento e circunferência para as densidades celulares (A) 1000 células, (B) 2000 células, (C) 5000 células, (D) 10000 células, (E) 20000 células e (F) 40000 células.

Para a linhagem A375 (Figura 36), os esferoides 3D formados a partir de 5000 células foram os que apresentaram as melhores características de uso em 72 horas após plaqueamento, sendo estes de diâmetro 304,54 \pm 22,66 μ m², circunferência de 0,81 \pm 0,05 e arredondamento de 0,96 \pm 0,02.



Figura 36. Caracterização dos esferoides 3D da linhagem A375 nos parâmetros diâmetro, arredondamento e circunferência para as densidades celulares (A) 1000 células, (B) 2000 células, (C) 3000 células, (D) 5000 células, (E) 10000 células e (F) 20000 células.

A linhagem Sk-mel-103 (Figura 37) por sua vez nos primeiros dias não se compactou e este processo foi acontecendo com o tempo e observado a partir de 72 horas. As densidades celulares de 3000, 5000 e 10000 a partir de 72 horas não apresentam diferenças em seus diâmetros. A densidade 5000 células em 72 apresentou diâmetro $324,76 \pm 3,92 \ \mu m^2$, circunferência de $0,85 \pm 0,01$ e

arredondamento de 0,84 \pm 0,10. O arredondamento se aproxima de 0,9 em 168 horas, porém o diâmetro já se encontrava em quase 370 μ m².



Figura 37. Caracterização dos esferoides 3D da linhagem Sk-mel-103 nos parâmetros diâmetro, arredondamento e circunferência para as densidades celulares (A) 1000 células, (B) 2000 células, (C) 3000 células, (D) 5000 células, (E) 10000 células e (F) 20000 células.

Por fim, a linhagem 1205Lu (Figura 37) apresenta uma formação lenta do esferoide, apresentando compactação apenas após 120 horas. O diâmetro se inicia alto, pois as células ainda não estão formando uma rede, e ele começa a reduzir com o tempo.



Figura 38. Caracterização dos esferoides 3D da linhagem 1205Lu nos parâmetros diâmetro, arredondamento e circunferência para as densidades celulares (A) 1000 células, (B) 2000 células, (C) 3000 células, (D) 5000 células, (E) 10000 células e (F) 20000 células.

Inversamente proporcional ao diâmetro a circunferência e o arredondamento aumentam. Em 120 horas o esferoide formado a partir de 5000 células apresenta 280,51 ± 57,82 µm² de diâmetro, circunferência de 0,78 ± 0,06 e arredondamento de 0,82 ± 0,17; em 144 horas apresenta 287,57 ± 50,39 µm² de diâmetro, circunferência de 0,82 ± 0,08 e arredondamento de 0,86 ± 0,14; e em 168 horas apresenta 295,56 ± 34,21 μ m² de diâmetro, circunferência de 0,85 ± 0,04 e arredondamento de 0,90 ± 0,07.

Desta forma, a padronização dos esferoides levou em consideração o diâmetro em torno de 300 μ m², porém com o maior arredondamento e circunferência possível. Foram determinadas as condições de 5000 células para as linhagens A375, Sk-mel-103 e 1205Lu, com tempos de plaqueamento de 72 horas para a A375 e Sk-mel-103 e 120 horas para 1205Lu; a linhagem de câncer escamoso, A431, pode ser utilizada a partir de 24 horas de plaqueamento e a densidade poderá ser variável optando-se neste trabalho para a densidade de 20000 células.

Aldaghi *et al.* (2019) avaliou a efeitos de fármaco em esferoide 3D da linhagem A375 com mutação do tipo BRAF. Os autores utilizaram a mesma metodologia de preparo dos esferoides que o presente trabalho, o método de flutuação forçada, e obtiveram esferoide de diâmetro médio em torno de 100 μ m² a partir de um plaqueamento de 1000 células (ALDAGHI; JALAL, 2019).

Hernández *et al.* (2019) desenvolveram um esferoide 3D da linhagem A431 e os autores obtiveram as mesmas condições de formação que o presente trabalho. Os esferoides apresentaram alto arredondamento e esfericidade, além de diâmetro em torno de 200 µm². Os autores estudaram a biodistribuição de anticorpos no modelo e obtiveram resultados promissores no quesito de permeação até o centro do esferoide (BELTRÁN HERNÁNDEZ et al., 2019). Para os esferoides das linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu, os autores Massaro *et al.* (2017) e Smalley *at al.* (2006) respectivamente, utilizaram 5000 células para a formação 3D e puderam avaliar proliferação, invasividade bem como ação de fármacos (MASSARO et al., 2017; SMALLEY et al., 2006).

4.9.4. Estudos de Viabilidade Celular em cultivo tridimensional (3D)

Assim como para o cultivo bidimensional, o estudo de viabilidade celular foi realizado para o cultivo tridimensional, utilizando os esferoides padronizados na sessão 4.9.3.

O cultivo de linhagens celulares em monocamadas tem sido amplamente empregados nos últimos anos para a triagem de moléculas, que possam ser utilizadas em tratamentos de doenças em geral, e também são utilizadas na avaliação de sistemas nanoparticulados, onde é possível realizar a seleção de nanosistemas tóxicos / não tóxicos, bem como observar padrões de toxicidade em relação à fármacos livres, e ainda observar *uptake* celular (BAULETH-RAMOS et al., 2020; LUIZ et al., 2021; MÓ et al., 2020).

Porém, no que diz respeito a avaliações antitumorais, o uso de cultivos em monocamadas, bidimensionais, embora ainda úteis na geração de informações de triagem, são modelos onde há extensiva perda de informação, em relação a tumores biológicos. Modelos organizados em 2D não conseguem reproduzir a organização do tumor sólido in vivo, perdendo aspectos importantes da arquitetura que são cruciais na avaliação de eficácia, toxicidade, bem como internalização. As organizações tridimensionais, por sua vez, mimetizam as orientações celulares, a comunicação das células envolvidas na formação do tumor, bem como sua arquitetura e rede de formação. À medida que se observa um tumor in vivo, da superfície ao seu interior, é possível notar que o gradiente passivo de difusão de O₂, CO₂, nutrientes, é modificado. Essa característica torna o interior tumoral um local que sofre constantemente hipóxia, além de extremamente compacto e de difícil acesso. Desta forma, esferoides em organização 3D, tornam as avaliações in vitro mais próximas da avaliação in vivo, permitindo observações condizentes com cenários reais (BAULETH-RAMOS et al., 2020; LUIZ et al., 2021; MO et al., 2020; NUNES et al., 2019; TOFANI et al., 2020).

Os esferoides desenvolvidos para as linhagens tumorais, A431, A375, Skmel-103 e 1205Lu, obtiveram diferentes características no que diz respeito a sua formação e desenvolvimentos, sendo alguns mais frouxos, outros mais compactos, alguns crescem durante o tempo, outros estacionam seu crescimento e se compactam. Essas diferenças impactam na capacidade de um ativo e ou nanosistemas penetrarem até o interior da estrutura, modificando então, padrões de viabilidade.

Para a linhagem A431 (Figura 38) os padrões de toxicidade em 3D são os mesmos observados em 2D, porém em menor intensidade. Observa-se a tendencia do esferoide em reduzir sua viabilidade quando é exposto ao siRNA Bcl-2 complexado ao CLN, ainda é possível observar que o CLN 5-FU + siRNA Bcl-2 reduz significativamente a viabilidade do esferoide. Assim como na organização 2D, os siRNAs Gli-1 e siRNA EGFR causam menores impactos que o siRNA Bcl-2.



Figura 39. Estudo de viabilidade celular em cultura tridimensional (3D) da linhagem A431, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o *pool*, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos. (n=16).

Para a linhagem de melanoma, A375 (Figura 40), por sua vez, só foi possível a determinação do IC₅₀ para o CLN sem 5-FU, com o siRNA Bcl-2, os demais siRNAs associados ao CLN sem o fármaco, não impactaram a viabilidade acima de 50%. Os siRNAs Gli-1 e EGFR, associados ao CLN com ou sem 5-FU, não demonstraram grandes impactos na viabilidade do esferoide. Fica evidente, quando há o uso do *pool* (combinação dos três siRNAs), que o maior responsável pela redução da viabilidade é o siRNA Bcl-2, porém há uma ação sinérgica se estabelecendo, pois, a curva de viabilidade tem uma tendência a ser menor do que para as combinações duplas. E quando há o uso do CLN 5-FU combinado a duplas de siRNAs, observa-se a ação do siRNA Bcl-2 majoritária em relação aos demais, pois a curva se assemelha ao CLN 5-FU + siRNA Bcl-2. Desta forma para o esferoide da linhagem A375, o uso da combinação 5-FU + siRNA Bcl-2 se mostrou a combinação mais efetiva.



Figura 40. Estudo de viabilidade celular em cultura tridimensional (3D) da linhagem A375, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o *pool*, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos. (n=16).

A linhagem Sk-mel-103 se mostrou uma linhagem de formação espontânea de esferoides mais frouxos inicialmente, tornando-se altamente compactos ao longo do tempo e apresentando centro necrótico evidente. Atribuise a essas características os resultados obtidos no estudo de viabilidade 3D (Figura 41) onde praticamente todos os tratamentos dificilmente afetaram a viabilidade do esferoide acima de 50%. Quando comparados a organização 2D, pode-se notar que houve extrema redução da toxicidade dos tratamentos em geral, porém a capacidade de os três siRNAs afetarem essa linhagem foi observada, entretanto ressalta-se que para impactar a viabilidade deste esferoide foi necessária a utilização do CLN 5-FU + *pool* siRNAs.



Figura 41. Estudo de viabilidade celular em cultura tridimensional (3D) da linhagem Sk-mel-103, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o *pool*, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos. (n=16).

Por fim o esferoide da linhagem 1205Lu (Figura 42), que assim como da linhagem Sk-mel-103, se mostrou altamente frouxo inicialmente, e com o tempo se compacta de modo a reduzir seu diâmetro significativamente. A mesma observação pode ser feita em relação a extrema redução da influência dos tratamentos na viabilidade, quando comparado ao arranjo em 2D. Porém para essa linhagem, fica ainda mais evidente a necessidade do uso da combinação do 5-FU com os três siRNAs, associados no CLN, para obtenção de resultados significativos de redução da viabilidade do esferoide, destacando-se o CLN 5-FU + siRNAs Bcl-2 e Gli-1, que também geram redução significativa da viabilidade.



Figura 42. Estudo de viabilidade celular em cultura tridimensional (3D) da linhagem 1205Lu, em 24 horas de exposição aos tratamentos (A) CLN controle e contendo siRNAs individuais, (B) CLN contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o *pool*, contendo os 3 siRNAs específicos, (C) 5-FU em solução aquosa, CLN 5-FU sem siRNA bem como contendo siRNAs individuais, (D) CLN 5-FU contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs em duplas bem como o pool, contendo combinações dos siRNAs em duplas bem como o pool, contendo os 3 siRNAs específicos. (n=16).

Através dos estudos de viabilidade nos esferoides 3D, pode-se, para todas as 4 linhagens estudadas, generalizar que houve significativa redução da redução da viabilidade com os tratamentos em geral, demonstrando assim que a organização em 3D consegue capturar a dificuldade que o tratamento tem em sofrer *uptake* nessa organização estrutural. O que por consequência, auxilia no entendimento do que ocorrerá em um tumor *in vivo*. Em alguns casos ainda, pode-se observar diferentes padrões de resultados de IC₅₀, em relação ao 2D, indicando que a arquitetura 3D modifica a interação das células com os tratamentos (Tabela 16).

Porém, ainda se ressalta a importância de mimetizar um tumor *in vivo* cada vez mais próximo ao cenário real, o que se trataria da combinação de linhagens celulares pertencentes ao ambiente de desenvolvimento deste tumor, como por exemplo, o uso de fibroblastos.

Tratamentos / Linhagens		A431	A375	Skmel-103	1205 Lu
CLN controlo	№ NPs	5,47 x10¹º ▲	5,53 x 10¹º▲	7,79 x10¹0▲	7,17 x 10 ¹⁰ ▲
CEN CONTOIe	Concentração	N.A	N.A	N.A	N.A
	№ NPs	2,89 x10 ⁹	7,26 x10 ⁸	4,64 x10 ⁹	8,61 x10 ⁸
CEN 5-1 0	Concentração	444,2 µM	111,7 µM	71,38 µM	132,5 µM
5-EU solução	№ NPs	N.A	N.A	N.A	N.A
5-r o solução	Concentração	801,6 µM	1085 µM	1355 µM ●	1530 µM ●
CLN si BCL-2	№ NPs	2,03 x10 ¹⁰	1,05 x10 ¹⁰	3,94 x10 ¹⁰	3,20 x10 ¹⁰
CLN SI DOL-2	Concentração	18,01 nM	5,25 nM	19,68 nM	16,02 nM
	№ NPs	4,10 x10 ¹⁰	4,66 x10 ¹⁰	5,92 x10 ¹⁰	6,42 x10¹⁰●
	Concentração	20,5 nM	23,29 nM	29,58 nM	32,12 nM ●
	№ NPs	5,90 x10 ¹⁰	6,81 x10 ¹⁰	7,19 x10¹⁰●	7,07 x10¹⁰●
CEN SI LGI K	Concentração	29,51 nM	34,05 nM	35,98 nM ●	35,36 nM ●
CLN siRNA scrambled	№ NPs	2,03 x10 ¹⁰ ▲	6,69 x10¹⁰▲	7,19 x10¹⁰●	6,25 x10¹⁰●
	Concentração	N.D ●	N.D •	35,97 nM ●	31,27 nM ●
CIN siBCI -2 + siGli-1	№ NPs	2,36 x10 ¹⁰	1,20 x10 ¹⁰	4,17 x10 ¹⁰	3,17 x10 ¹⁰
	Concentração	11,82 nM	6,00 nM	20,86 nM	15,85 nM
CLN siBCL-2 + siEGER	№ NPs	2,15 x10 ¹⁰	1,23 x10 ¹⁰	3,37 x10 ¹⁰	3,26 x10 ¹⁰
	Concentração	10,76 nM	6,16 nM	16,88 nM	16,30 nM
CLN siEGER + siGli-1	№ NPs	2,57 x10 ¹⁰	4,37 x10 ¹⁰	6,07 x10 ¹⁰ ●	7,01 x10¹⁰●
	Concentração	12,83 nM	N.D •	30,34 nM ●	35,07 nM ●
CIN pool siRNAs (Bcl-2 +Gli-2 + EGER)	№ NPs	1,53 x10 ¹⁰	9,96 x10 ⁹	3,45 x10 ¹⁰	2,64 x10 ¹⁰
	Concentração	7,65 nM	4,98 nM	17,27 nM	13,22 nM

Tabela 16. IC50 obtidos nos estudos de viabilidade bidimensionais (3D), confiança 95%. si - siRNA Aresultado aproximado, • confiança estatística >90%

Continuação Tabela 16.

	Nº NPs	8,74 x10 ⁹	6,13 x10 ⁸	2,92 x10 ⁸	5,25 x10 ⁸
CLN 5-FU + siBCL-2	Concontração	134,4 µM / 8,67	94,28 µM / 7,02	44,94 µM / 3,53	80,80 µM / 5,81
	Concentração	nM	nM	nM	nM
	Nº NPs	3,24 x10 ⁹	7,26 x10 ⁸	1,95 x10 ⁹	4,87 x10 ⁸
CLN 5-FU + siGli-1	Concentração	498,3 µM /	111,7 µM / 6,65	30,02 µM / 2,54	74,89 µM / 5,40
	Concentração	21,25 nM	nM	nM	nM
	Nº NPs	3,53 x10 ⁹	7,24 x10 ⁸	4,85 x10 ⁹	4,84 x10 ⁸
CLN 5-FU + siEGFR	Concentração	543,2 µM /	111,3 µM / 7,67	74,64 µM / 5,52	74,46 µM / 5,57
	Concentração	21,96 nM	nM	nM	nM
	Nº NPs	6,58 x10 ⁸	7,06 x10 ⁸	2,02 x10 ⁸	3,31 x10 ⁸
CLN 5-FU + siBCL-2 + siGli-1	Concentração	101,3 µM / 7,98	109 6 / 7 72 pM	31,10 µM / 2,57	52,13 µM / 4,14
	Concentração	nM	100,077,73110	nM	nM
	Nº NPs	7,11 x10 ⁸	6,76 x10 ⁸	3,76 x10 ⁸	3,39 x10 ⁸
CLN 5-FU + siBCL-2 + siEGFR	Como o retro o ão	109,3 µM / 8,32	102 0 / 7 51 pM	57,88 µM / 4,39	50,98 µM / 4,36
	Concentração	nM	103,977,31110	nM	nM
	Nº NPs	2,07 x10 ⁹	7,16 x10 ⁸	2,64 x10 ⁸	3,39 x10 ⁸
CLN 5-FU + siGli-1 + siEGFR	Concontração	318,1 µM /	110 2 / 7 74 pM	40,70 µM / 3,29	52,17 µM / 4,49
	Concentração	16,67 nM	110,277,74110	nM	nM
	Nº NPs	5,74 x10 ⁸	7,11 x10 ⁸	2,10 x10 ⁸	3,05 x10 ⁸
CLN 5-FU + pool siRNAs (Bcl-2 +Gli-2 + EGFR)	Concentração	88,25 µM / 6,77	100 / / 8 36 pM	32,24 µM / 2,69	46,98 µM / 3,96
	Concentração	nM	103,470,30110	nM	nM

De modo a observar as diferenças geradas a partir dos experimentos de viabilidade em plataforma 2D e 3D, a Tabela 17 sumariza as influências dos tratamentos para cada linhagem, evidenciando a linhagem que mais foi afetada em cada modelo, para cada tratamento.

Tabela 17. Influências dos tratamentos em cada linhagem tumoral de acordo com a plataforma estudada, cultivo bidimensional (2D) e tridimensional (3D). Legenda: • muito sensível, • sensível, • razoavelmente sensível, • pouco sensível, • não determinado.

Tratamentos/ Linhagens	A431		A375		Sk-mel-103		1205Lu	
Plataforma	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D
CLN controle	٠	•	•	•	•	•	•	٠
CLN 5-FU	•	•	•	•	•	•	•	•
5-FU solução	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN siBCL-2	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN siGli-1	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN siEGFR	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN siRNA scrambled	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN siBCL-2 + siGli-1	٠	•	•	•	•	•	•	•
CLN siBCL-2 + siEGFR	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN siEGFR + siGli-1	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN pool siRNAs (Bcl-2 +Gli-2 + EGFR)	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN 5-FU + siBCL-2	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN 5-FU + siGli-1	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN 5-FU + siEGFR	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN 5-FU + siBCL-2 + siGli-1	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN 5-FU + siBCL-2 + siEGFR	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN 5-FU + siGli-1 + siEGFR	•	•	•	•	•	•	•	•
CLN 5-FU + pool siRNAs (Bcl-2 +Gli-2 + EGFR)	•	•	•	•	•	•	•	•

Sugere-se que as características de compactação dos esferoides formados modificaram a permeabilidade dos tratamentos na massa tumoral formada, e então os esferoides mais compactos, da linhagem A431 e A375 conseguiram exibir menor sensibilidade aos tratamentos que as linhagens de esferoides mais frouxos, Sk-mel-103 e 1205Lu. Os esferoides formados pelas linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu apresentaram-se mais sensíveis, principalmente para os tratamentos mais potentes, com combinações, do que as demais.

Uma observação interessante que pode ser feita é em relação aos padrões de toxicidade, que dificilmente foram mantidos da plataforma 2D para 3D, evidenciando o quão a organização celular, interações e arquitetura, podem influenciar no resultado obtido.

Tofani *et al.* (2020) estudaram essas diferenças de viabilidades obtidas em cultivos 2D e 3D para linhagens de câncer de ovário, OVCAR-3 e SKOV-3, e os resultados obtidos pelos autores foram simulares ao presente trabalho, onde as porcentagens de viabilidade eram significativamente menores na plataforma 2D (TOFANI et al., 2020).

Luiz *et al.* (2021) e Lakkadwala & Singh (2018) estudaram a permeabilidade de lipossomas em esferoides 3D da linhagem de Glioblastoma U87. Ambos conseguiram em seus trabalhos pontuar as mesmas observações em relação a menores viabilidades em plataforma 2D. Os autores neste caso estudaram não só a relação da viabilidade em relação ao fármaco, docetaxel e 5-FU respectivamente, mas conseguiram mostrar o quão a funcionalização pode auxiliar no uptake de nanopartículas em plataformas 3D (LAKKADWALA; SINGH, 2018; LUIZ et al., 2021).

Lollo *et al.* (2018) desenvolveram nanocápsulas lipídicas contendo 5-FU para o tratamento de câncer de colo retal, e avaliaram essa nanoestrutura em modelos de esferoides 3D, onde observaram a ação pronunciada do 5-FU quando encapsulado, condizentes com o presente trabalho, bem como uma menor % de viabilidade em 2D do que nos esferoides 3D (LOLLO et al., 2019).

4.9.5. Uptake celular em Microscopia Confocal e Citometria de Fluxo

Assim como nos experimentos de viabilidade celular, os experimentos de transfecção foram realizados inicialmente na linhagem não tumoral, de queratinócitos humanos (HaCaT) para fins de controle e de modo a observar o *uptake* em diferentes linhagens e comportamentos de endocitose.

Para HaCaT (Figura 43) tanto o CLN como Lipofectamina 3000[®] sofreram *uptake*, porém para o sistema proposto, o CLN, o *uptake* observado através do canal Alexa 647, ocorre em tempo menores, sendo observado a partir da primeira hora, porém para Lipofectamina 3000[®], observa-se mais intensamente após a 4^ª hora.



Figura 43. Imagem representativa de Microscopia de Confocal do ensaio de uptake celular na linhagem HaCaT, nos tempos de 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas. 40 ×, λ = 405 nm e λ = 638 lasers, adequadas para DAPI e Alexa 647, respectivamente. A barra de escala indica 100 µm.

Em seguida da linhagem não tumoral, a primeira linhagem tumoral estudada foi a linhagem de câncer não melanoma A431 (Figura 44). Para esta, observou-se um padrão de intensidade de brilho, no canal Alexa 647, menos intenso, porém tanto para o CLN como para Lipofectamina 3000[®] o *uptake* ocorreu a partir da primeira hora.



Figura 44. Imagem representativa de Microscopia de Confocal do ensaio de *uptake* celular na linhagem A431, nos tempos de 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas. 40 ×, λ = 405 nm e λ = 638 lasers, adequadas para DAPI e Alexa 647, respectivamente. A barra de escala indica 100 µm.

A linhagem A375 por sua vez (Figura 45) apresentou-se com intensidade de brilho no canal Alexa 647 mais intenso que para A431, porém com a mesma observação, que o *uptake* já ocorria para ambos, Lipofectamina 3000[®] e CLN, a partir da primeira hora.



Figura 45. Imagem representativa de Microscopia de Confocal do ensaio de *uptake* celular na linhagem A375, nos tempos de 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas. 40 ×, λ = 405 nm e λ = 638 lasers, adequadas para DAPI e Alexa 647, respectivamente. A barra de escala indica 100 µm.

Para a linhagem Sk-mel-103 (Figura 46) o resultado assemelha-se a A375, com padrão de brilho elevado e a linhagem 1205Lu (Figura 47) o resultado assemelha-se a A431, com padrões mais baixos de brilho. Entretanto, para todas as linhagens tumorais, o *uptake* ocorreu a partir a da primeira hora, mantendo-se durante o tempo.



Figura 46. Imagem representativa de Microscopia de Confocal do ensaio de *uptake* celular na linhagem Sk-mel-103, nos tempos de 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas. 40 ×, λ = 405 nm e λ = 638 lasers, adequadas para DAPI e Alexa 647, respectivamente. A barra de escala indica 100 µm.



Figura 47. Imagem representativa de Microscopia de Confocal do ensaio de *uptake* celular na linhagem 1205Lu, nos tempos de 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas. 40 ×, λ = 405 nm e λ = 638 lasers, adequadas para DAPI e Alexa 647, respectivamente. A barra de escala indica 100 µm.

Através dos resultados de *uptake* em cultivo 2D pode-se sugerir que houve uma distribuição igualitária de nanopartículas nas células, pois há uma observação de brilho, no canal Alexa 647, distribuído homogeneamente em todos os campos de observação.

Este resultado é diferentemente observado em cultivo 3D (Figura 48), onde observa-se, para todas as linhagens, uma distribuição majoritária nas bordas dos esferoides. Isso se dá, devido principalmente a baixa permeabilidade nessas estruturas, onde há uma rede organizada entre as células, de modo a dificultar a penetração de estruturas e/ou moléculas.

Dentre os esferoides, aquele que apresentou um padrão de brilho mais distribuído pela estrutura foi a linhagem A431, seguido da linhagem 1205Lu, e sugere-se que para a linhagem A431 isso ocorreu devido ao seu menor diâmetro em relação às demais, e para a linhagem 1205Lu, sugere-se que isso ocorreu devido ao padrão de organização do esferoide gerado por essa linhagem ser mais frouxo que as demais.

Portanto, realizou-se para o esferoide da linhagem A431, um estudo de imagem em 3D em microscopia de confocal, onde possibilitou-se compreender a real distribuição do CLN marcado com Alexa 647. Na Figura 49 observa-se o CLN através do brilho no canal Alexa 647 e a hipótese da sua distribuição apenas nas bordas do esferoide é confirmada.



Figura 48. Imagem representativa de Microscopia de Confocal do ensaio de *uptake* celular em 24 horas dos esferoides 3D gerados a partir das linhagens tumorais A431, A375, Sk-mel-103, 1205Lu. 20 ×, λ = 405 nm e λ = 638 adequados para DAPI e Alexa 647, respectivamente. A barra de escala indica 300 µm.

Com o auxílio do estudo de imagem em 3D, pode-se observar que o CLN se concentra nas bordas do esferoide, e em alguns pontos consegue permear, porém em 24 horas, não é possível uma distribuição homogênea nas células que compões o esferoide.



Figura 49. Estudo 3D de imagem em Microscopia de Confocal dos esferoides 3D obtidos da linhagem A431 sendo eles: controle, onde não houve aplicação do CLN e experimental, onde o CLN marcado com Alexa 647 foi aplicado e analisado 24 horas após aplicação. 20 ×, λ = 405 nm, λ = 535 e λ = 638 adequados para DAPI, Rodamina 123 e Alexa 647, respectivamente. A barra de escala indica 300 µm.

Desta forma, o estudo de *uptake* por citometria de fluxo (Figura 50) traz consigo informações importantes nas quais consegue-se correlacionar com as imagens de confocal.


Figura 50. Estudo de *uptake* em citometria de fluxo em cultivos (A) 2D e (B) 3D. $\lambda = 638$ nm, para Alexa 647, a viabilidade celular foi acompanhada utilizando lodeto de Propídio. Para cada experimento foram capturados 20000 eventos. Análises estatística foram realizadas através de Two-way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's Test.

Pode-se observar que o *uptake* ocorre de modo coincidente com as imagens de confocal onde o cultivo 2D exibe uma transfecção superior que o cultivo 3D. Entre as linhagens, no cultivo 2D (Figura 50-A) o *uptake* das linhagens A431 e A375 são iguais à linhagem não tumoral HaCaT, porém nas linhagens tumorais, o CLN apresenta *uptake* superior à Lipofectamina 3000[®]. As linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu apresentaram as maiores porcentagens de *uptake* e não houve diferença entre CLN e Lipofectamina 3000[®]. No cultivo 3D por sua vez (Figura 50-B), o CLN se internaliza em maiores porcentagens nas linhagens A431 e 1205Lu, condizentes com as imagens de confocal.

Estes resultados eram esperados, visto que os modelos de esferoides 3D apresentam uma arquitetura organizada o bastante para dificultar a permeação de moléculas ou estruturas passivamente, assim como ocorre *in vivo* (MÓ et al., 2020). Por este motivo a avaliação nestes modelos é considerada importante como estudo pré-clínico. Juntamente com os estudos 2D, os estudos de transfecção 3D sugerem que o CLN é capaz de internalizar-se eficientemente, dentro das limitações inerentes a cada plataforma de avaliação.

4.9.6. Determinação da via endocítica de internalização

A determinação da internalização de nanoestruturas em geral em células alvo é de extrema importância na garantia da efetividade, da sua atividade farmacológica proposta, porém ainda existem muitos mecanismos que envolvem este processo de entrada destas estruturas para serem estudados. Um destes mecanismos diz respeito a via na qual essas nanoestruturas são internalizadas.

Estudos que demonstrem como nanopartículas são internalizadas, bem como seu caminho biológico, degradação e as respostas celulares desencadeadas são imprescindíveis para melhores entendimentos da nanotoxicologia. Desta forma, após estudar a internalização propriamente dita, os estudos moleculares sobre interações nanopartículas-células, endocitose, tráfego intracelular e resposta celular a estes materiais devem ser prioritários para uma predição toxicológica sobre essas nanoestruturas.

A endocitose é um dos mecanismos de internalização de moléculas mais comumente estudado quando se trata da interação nanopartículas-células. Este mecanismo está baseado no fluxo transmembrana, bidirecional de vesículas contendo conteúdo extracelular. A endocitose pode ser dividida em fagocitose e pinocitose, sendo essa última podendo ser dividida em endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e macropinocitose (DONAHUE; ACAR; WILHELM, 2019; DOS REIS et al., 2021; LIN et al., 2018).

Cada tipo de nanoestrutura pode ser internalizada por uma via, seja mediada por clatrina, caveolina, ou até mesmo independente dessas vias. Já foi postulado diversos fatores nos quais podem influenciar a "escolha" da via. Diferenças na composição de nanopartículas influenciam diretamente a endocitose, bem como o formato, tamanho, características da superfície, sejam ligantes específicos ou até mesmo porosidade, carga superficial, elasticidade, entre outros (FOROOZANDEH; AZIZ, 2018; RENNICK; JOHNSTON; PARTON, 2021).

A utilização de inibidores para compreensão das vias predominantes na entrada de determinados nanocompostos vem sido amplamente utilizada nos últimos anos, no entanto é importante frisar que nenhuma nanoestrutura terá sua internalização 100% apenas por uma via, pois o processo de internalização se trata de um processo dinâmico e baseado na disponibilidade do nanocompostos bem como metabolização celular. Desta forma, mesmo se tratando da mesma nanoestrutura podem ocorrer diferenças na internalização da mesma em diferentes linhagens celulares e condições de cultivo (KAFSHGARI; HARDING; VOELCKER, 2015; RENNICK; JOHNSTON; PARTON, 2021; VERCAUTEREN et al., 2010). No presente trabalho, para inibição da via endocítica dependente de caveolina utilizou-se os inibidores Genisteína, Nistatina e Metil beta ciclodextrina (MβCD). A Genisteína será responsável pela disruptura da atividade tirosina kinase, a Nistatina é capaz de interagir com moléculas de colesterol na membrana, causando interrupção na entrada, e a MβCD causa depleção de colesterol seguida por dissociação de importantes proteínas que mediam a internalização (KAFSHGARI; HARDING; VOELCKER, 2015; VERCAUTEREN et al., 2010).

Na inibição da via mediada por clatrina utilizou-se Clorpromazina e Cloreto de amônio, sendo a Clorpromazina um dos inibidores mais eficientes desta via pois atua bloqueando a formação de invaginações da membrana, impossibilitando totalmente a formação das vesículas endocíticas; e o Cloreto de amônio por sua vez atua no desbalanço de cargas e modificações de pH (CHEN et al., 2018; KAFSHGARI; HARDING; VOELCKER, 2015; WANG et al., 2018). E por fim, de modo a inibir a macropinocitose utilizou-se o Cloridrato de Amilorida, um fármaco capaz de causar trocas de prótons que desestabilizam a membrana (HUA et al., 2019).

Para utilização adequada de cada inibidor avaliou-se inicialmente concentrações nas quais não apresentassem alteração da viabilidade celular abaixo de 90% (Figura 51-A) e selecionou-se a concentração na qual seria utilizada como inibidor. A molécula que mais apresentou-se toxica foi a Genisteína, seguida da Nistatina e MβCD, as demais apresentaram baixa toxicidade nas concentrações utilizadas.

Desta forma, procedeu-se o ensaio de inibição (Figura 51-B) onde foi possível observar que o CLN sem nenhuma via inibida obteve por volta de 80% de internalização, e esta porcentagem não se alterou frente aos inibidores: Nistatina, MβCD e Cloridrato de Amilorida. O CLN apresentou queda na internalização frente ao inibidor Genisteína, e queda ainda mais significativa com os inibidores Cloreto de amônio e Clorpromazina.

Portanto, sugere-se que o CLN desenvolvido apresenta internalização majoritária por endocitose mediada por clatrina, e uma menor porcentagem de internalização via endocitose mediada por caveolina. Não apresentou internalização por macropinocitose.

146



Figura 51. Determinação da via endocítica de internalização do CLN desenvolvido, sendo inicialmente avaliada a (A) viabilidade da linhagem A431 frente aos diferentes inibidores de modo a selecionar a concentração ideal para atuar na inibição da via, seguido da (B) determinação da internalização do CLN após inibição das vias utilizando os respectivos inibidores. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95 % de confiança, Tukey's test.

Este resultado é condizente com a literatura no que diz respeito a vias de internalização de sistemas lipídicos, principalmente sistemas catiônicos, como o CLN proposto. A membrana plasmática da célula possui uma carga negativa pronunciada, portanto, nanocarreadores carregados positivamente em geral mostram uma ligação melhorada à superfície celular. Essa ligação favorece o englobamento desta nanoestrutura, formando vesículas revestidas por clatrina. A pequena porção internalizada por mediação de caveolina deve-se à CLN menores de 100 nm que são formados no processo, e estes são majoritariamente englobados pelas invaginações mediadas por caveolina (FOROOZANDEH; AZIZ, 2018; KAFSHGARI; HARDING; VOELCKER, 2015).

4.10. Atividade antitumoral *in vitro*

4.10.1. Estudos de migração celular (*Scratch assay*)

A migração celular é essencial para muitos processos biológicos, ela pode indicar eventos como reparação e regeneração de tecidos; no entanto, o regulamento aberrante deste processo está intimamente relacionado a progressão de muitas doenças, incluindo invasão e metástase de câncer (ALMEIDA et al., 2019).

Uma das formas mais simples experimentalmente falando, de se conhecer sobre a capacidade migratória de linhagens celulares consiste no ensaio "*Scratch*" que se baseia na realização de um corte longitudinal, no centro

de uma cultura de células em monocamada, e então observa-las em relação a sua capacidade migratória nesse corte (JONKMAN et al., 2014; PINTO et al., 2019a).

Inicialmente padronizou-se o tempo que cada linhagem levaria para o completo fechamento do corte (*Scratch*) (Figura 52). A linhagem A431 foi a que mais levou tempo para fechar por completo, seguido das linhagens de melanoma, sendo a A375 a mais demorada, e as linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu, já estavam completamente fechadas em 24 horas. Essa determinação é importante para comparação com os tratamentos, de modo a compreender a influência dos mesmos na capacidade migratória de cada linhagem.



Figura 52. Padronização do ensaio de migração celular nas linhagens tumorais A431, A375, Sk-mel-103 e 1205Lu. As linhagens foram submetidas ao *Scratch* quando os poços se apresentavam em 100% de confluência e foram acompanhadas até completado fechamento do *Scratch*. A porcentagem de migração foi determinada de acordo com a redução da área inicial no tempo zero de cada poço, e as células que cresceram isoladas no interior do *Scratch* também foram contabilizadas através da contagem de partículas em ImageJ NIH. Em amarelo a demarcação do *Scratch* realizado no tempo zero, em azul a área que demarca a migração, quando essa ainda é inferior a 100%.

Conforme Figura 53, pode-se inferir que o CLN controle bem como complexado com siRNA *Scrambled* (aleatório/ controle negativo) não interferiram na migração de nenhuma das linhagens.



Figura 53. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: CLN controle nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN siRNA scrambled nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's teste.

O fármaco 5-FU em solução por sua vez, e o mesmo encapsulado no CLN (Figura 54) foram capazes de influenciar na migração das linhagens. A linhagem A431 teve sua migração sensível ao CLN 5-FU, visto que o aumento da concentração e número de nanopartículas (NPs) foi diretamente proporcional a redução da migração. Para a linhagem A375 o fármaco livre influenciou expressivamente a migração, e o mesmo encapsulado causou apenas uma pequena inibição da migração. As linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu foram as que menos sofreram influência na migração com estes dois tratamentos.

Na Figura 55 pode-se observar a influência do CLN contendo cada siRNA individualmente, sendo a linhagem A375 a que mais sofreu influência na migração frente ao CLN siRNA Bcl-2, que com a maior concentração (15 nM) conseguiu inibir mais de 75% da migração dessa linhagem. Essa mesma linhagem foi a mais influenciada pelo CLN siRNA Gli-1, porém de forma menos intensa, e o CLN siRNA EGFR por sua vez, apresentou inibição da migração nas linhagens A431 e A375. As linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu mostraram-se resistentes a estes tratamentos, tendo suas porcentagens de migração praticamente as mesmas que os controles experimentais.



Figura 54. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: 5-FU nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN 5-FU nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's teste.



Figura 55. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: CLN siRNA Bcl-2 nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN siRNA Gli-1 nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu; e CLN siRNA EGFR nas linhagens (I) A431, (J) A375, (K) Sk-mel-103 e (L) 1205Lu. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's teste.

Quando ocorreu o agrupamento de dois siRNAs no CLN (Figura 56) o efeito dos tratamentos foi sinérgico e houve ainda mais redução da migração das linhagens A375 e A41, a linhagem 1205Lu apresentou sensibilidade moderada e a Sk-mel-103 continuou a ser capaz de manter seu padrão migratório.



Figura 56. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: CLN siRNA Bcl-2 + siRNA Gli-1 nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN siRNA Bcl-2 + siRNA EGFR nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu; e CLN siRNA Gli-1 + siRNA EGFR nas linhagens (I) A431, (J) A375, (K) Sk-mel-103 e (L) 1205Lu. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's teste.

Associando então os siRNAs individuais no CLN 5-FU (Figura 57) observa-se que o efeito na migração, para as linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu, é pouco diferente dos CLNs com siRNAs apenas, ou CLN 5-FU sem siRNAs. Este resultado demonstra que essa associação do CLN 5-FU com apenas um siRNA não é efetiva para essas linhagens. Enquanto que as linhagens A375 e A341 tiveram suas migrações ainda mais reduzidas, demonstrando efetividade na associação.

No entanto, ao associar dois siRNAs ao CLN 5-FU (Figura 58) pode-se observar uma redução significativa na migração das duas linhagens mais resistentes, Sk-mel-103 e 1205Lu. A migração para A375 e A431 apresenta-se com padrão similar quando somente um siRNA é associado ao CLN 5-FU.



Figura 57. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: CLN 5-FU + siRNA Bcl-2 nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN 5-FU + siRNA Gli-1 nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu; e CLN 5-FU + siRNA EGFR nas linhagens (I) A431, (J) A375, (K) Sk-mel-103 e (L) 1205Lu. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's teste.

Por fim, pode-se observar o efeito da associação do CLN contendo o *pool* de siRNAs bem como CLN 5-FU com o *pool* de siRNAs (Figura 59). Finalmente, há uma redução significativa para as linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu, sendo que o CLN 5-FU + *pool* siRNAs e CLN *pool* siRNAs respectivamente, se mostraram eficientes na contenção da migração dessas células.

Para as linhagens A375 e A431 nota-se uma maior inibição da migração, porém, porcentagens efetivas de inibição já tinham sido alcançadas anteriormente, ressaltando a combinação CLN 5-FU + siRNA Bcl-2, para ambas linhagens.

Sugere-se que combinações diferentes de siRNAs com o CLN ou CLN contendo 5-FU, possam ser realizadas para inibir a migração a depender das características intrínsecas da linhagem. As linhagens Sk-mel-103 e 1205Lu, conhecidamente mais invasivas, necessitam de combinações mais agressivas para alcançar-se a mesma inibição da migração que linhagens menos agressivas.



Figura 58. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: CLN 5-FU + siRNA Bcl-2 + siRNA Gli-1 nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN 5-FU + siRNA Bcl-2 + siRNA EGFR nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu; e CLN 5-FU + siRNA Gli-1 + siRNA EGFR nas linhagens (I) A431, (J) A375, (K) Sk-mel-103 e (L) 1205Lu. Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's teste.



Figura 59. Determinação da % Migração frente aos tratamentos: CLN + *pool* siRNAs nas linhagens (A) A431, (B) A375, (C) Sk-mel-103 e (D) 1205Lu; CLN 5-FU + *pool* siRNAs nas linhagens (E) A431, (F) A375, (G) Sk-mel-103 e (H) 1205Lu; Análises estatísticas foram realizadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's teste.

4.10.2. Estudos de invasão celular

Determinar o fenótipo de invasão de células tumorais é tão importante quanto sua característica migratória, e a compreensão dos mecanismos moleculares é a base para novas estratégias clínicas além de sua importância no rastreio de tratamentos capazes de inibir essas características que *in vivo*, estão correlacionadas com invasividade e metástases.

Metástase é a principal causa de letalidade do câncer, 90% das mortes por tumores sólidos pode ser atribuída à disseminação metastática para outros tecidos. E o câncer de pele melanoma, apresenta altas chances de metástase a partir do final do segundo estágio de desenvolvimento (WANG et al., 2020b). Estudos pré-clínicos de possíveis novos tratamentos são determinantes na triagem de opções efetivas e a determinação e compreensão do processo de invasão e sua progressão representam um enorme desafio. Portanto, a quantificação de processos de invasão *in vitro* em linhagens de células tumorais pode ser uma ferramenta crucial para estudar novas potenciais opções terapêuticas (ANDERSON et al., 2019; PIJUAN et al., 2019).

No presente trabalho, inicialmente padronizou-se a condição do experimento, verificando-se a capacidade da célula, tanto no cultivo 2D como 3D em atravessar o poro de 1 µm, e para isso induziu-se utilizando SBF. Na Figura 60 se observa que as células 1205Lu podem passar através do poro independente da forma de cultivo, seja em plataforma 2D ou 3D, porém a presença ou ausência de SBF no compartimento superior o Transwell, estimula ou inibe / reduz sua passagem para o compartimento inferior. Quando há SBF no compartimento superior, as células tendem a permanecer neste compartimento, no entanto quando não há SBF no compartimento superior, às células tendem a migrar. E quando há SBF em ambos compartimentos às células migram, porém em função do tempo.

Após verificação da capacidade da linhagem em atravessar o poro, o ensaio de invasão foi realizado na presença dos diversos tratamentos e a Figura 61 sumariza os resultados para a plataforma 2D e 3D, normalizados para o controle, onde não houve aplicação de nenhum tratamento.

Para a plataforma de cultivo 2D observa-se que os tratamentos mais eficazes em inibir a capacidade de invasão da linhagem em 24 horas foram CLN multifuncional contendo 5-FU e o *pool* de siRNAs, CLN 5-FU + siBcl-2 e a

combinação CLN 5-FU + dupla de siRNAs Bcl-2 e Gli-1. Em 48 horas observase, além destes já mencionados em 24 horas, a combinação CLN 5-FU + dupla de siRNAs Bcl-2 e EGFR como altamente eficaz em deter a invasão, até mais eficaz que a combinação CLN 5-FU + dupla de siRNAs Bcl-2 e Gli-1.



Figura 60. Padronização do estudo de invasão celular utilizando Transwell 1 µm para a linhagem de melanoma 1205Lu, cuja característica de invasão se expressa naturalmente. Avaliou-se cultivo 2D e 3D durante 48 horas. Os dados referem-se as células que atravessaram os poros do Transwell nas condições: ambos compartimentos sem soro bovino fetal; compartimento superior sem soro bovino fetal e compartimento inferior com soro bovino fetal; compartimento superior sem soro bovino fetal e compartimento inferior sem soro bovino fetal; ambos compartimentos com soro bovino fetal. As letras referem-se a resultados estatisticamente iguais. Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's test, n=8 para cada condição.

Na plataforma 3D, os padrões de invasão são modificados, devido a organização das células entre si, desta forma pode-se observar um menor número de tratamentos capazes de influenciar na invasão natural desta linhagem. Entretanto as mesmas combinações mencionadas no cultivo 2D se replicam como aqueles tratamentos que impactam na invasão celular.

Tanto em 24 horas como em 48 horas, a invasividade da linhagem, em 2D ou 3D, foi avaliada baseada no número de células que estavam no compartimento inferior, ou seja, cruzaram os poros do Transwell. Porém, não basta ter a capacidade de atravessar, mas para manterem suas capacidades invasivas, as células precisam se manter íntegras de modo a continuar se proliferando. Deste modo, avaliou-se a integridade da cromatina dessas células utilizando Hoechst.

Para todos os tratamentos, as células que atravessaram, tanto do cultivo 2D como 3D, não exibiram nenhuma alteração nuclear, e na Figura 62 ressaltase o grupo experimental controle e o CLN multifuncional contendo tanto o fármaco 5-FU como o *pool* dos siRNAs, Bcl-2, Gli-1 e EGFR.



Figura 61. Gráficos Mapas de calor referentes ao Ensaio de invasão celular em Transwell da linhagem de melanoma 1205Lu após aplicação dos tratamentos nas condições de (A) cultivo 2D em 24 horas e (B) 48 horas e (C) cultivo 3D em 24 horas e (D) 48 horas. Os dados tratam-se das células que migraram através do poro, atingindo o compartimento inferior. A normalização foi realizada de acordo com o Controle. As barras de cores ao lado indicam a capacidade das células de atravessarem o poro, sendo essa capacidade maior na coloração vermelha e a inibição dessa capacidade de atravessar o poro vão em direção a coloração lilás / rosa. n=6 para cada tratamento.



Figura 62. Ensaio de invasão em Transwell: Imagens representativas dos grupos experimentais Controle e CLN multifuncional – 5-FU + *pool* siRNAs em cultivo (A) 2D e (B) 3D, onde observa-se tanto as células contidas no compartimento superior do Transwell, fotografadas em tempo real em Microscópio (Câmera Moticam 1080BMH), bem como as células contidas no compartimento inferior, tripsinizadas, fixadas e coradas com Hoechst (33342 Solução 20 μ M - Thermo Fisher Scientific), e observadas em Microscopio de Fluorescência (Axioplan 2 Imaging). n=6 para cada tratamento.

Embora as células que atravessaram não exibam nenhuma alteração nuclear, as células remanescentes no compartimento superior do Transwell, para o grupo controle seguem se proliferando, e pode-se notar no esferoide em 48 horas uma migração, exibindo desprendimento das células da superfície do esferoide. Para o grupo tratado por sua vez, nota-se que em cultivo 2D as células remanescentes começam a exibir desprendimento da monocamada e em cultivo 3D o esferoide apresenta certo crescimento, demonstrando que as células estão se proliferando, porém, atravessando em menor taxa que o grupo controle.

4.10.3. Estudos de Proliferação Celular, Apoptose e Necrose

Quando se diz respeito a lesões cancerosas, a avaliação da proliferação celular, bem como avaliações sobre processos de morte celular, incluindo apoptose e necrose, auxiliam no processo de triagem de tratamentos efetivos na contenção do crescimento tumoral.

Especialmente para este presente trabalho, onde há o uso de moléculas que afetam as vias de proliferação, apoptose, diferenciação celular e crescimento, o estudo das vias de morte celular frente às diferentes combinações de tratamento, bem como a determinação da permanência ou redução da proliferação da linhagem tumoral faz-se um importante estudo que antecede experimentos *in vivo*.

Estes ensaios foram de realizados com a linhagem A431, pois antecede o experimento *in vivo*, no qual utiliza esta linhagem na geração de um modelo de xenotransplante. Os tratamentos que mais geraram morte celular via necrose (Figura 63) foram os tratamentos que continham siRNA específico para EGFR em sua combinação. Apoptose por sua vez, tanto combinações contendo o fármaco 5-FU como o siRNA Bcl-2 foram capazes de aumentar a porcentagem de células sinalizando esta via. Sinalizando ambas as vias, indicando uma possível necroptose, também foram os tratamentos contendo siRNA EGFR.

Para proliferação celular (Figura 64) os resultados demonstraram que o siRNA Gli-1 é muito efetivo na redução das células em ciclo celular ativo, e as combinações dos siRNAs no CLN 5-FU são aqueles que geraram menor taxa de proliferação celular, porém quando utiliza-se o *pool* de siRNA, seja no CLN ou CLN 5-FU, é onde há o alcance das menores taxas de proliferação.

As diversas combinações possíveis só se fazem necessárias caso efeitos estatisticamente significativos não sejam alcançados em combinações simples, ou seja, a combinação de mais de um siRNA ou até mesmo o uso do *pool*, só é aconselhada caso os efeitos gerados gerem compensação de custo, visto que quando mais agentes ativos são inclusos, principalmente relacionados a terapia gênica, mais alto será o custo final de um produto, e mais chances de efeitos adversos (DELHOVE et al., 2020; VAN OVERBEEKE et al., 2021; WIRTH; PARKER; YLÄ-HERTTUALA, 2013).



Figura 63. Estudo das vias de morte celular, da linhagem A431 após as diferentes combinações de tratamentos, por citometria de fluxo utilizando os marcadores Anexina V e lodeto de propídio para apoptose e necrose respectivamente. Análises estatísticas foram avaliadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey teste, n=4 para cada tratamento. As letras representam igualdade estatística.

Embora o uso do *pool* de siRNAs foram efetivos na redução da proliferação (redução de ~ 60%), a taxa de apoptose alcançada com o tratamento CLN 5-FU Bcl-2 ainda é significativamente superior, e este tratamento ainda consegue uma redução de cerca de 50% da proliferação.

Portanto, sugere-se que o tratamento CLN 5-FU + siRNA Bcl-2, em relação ao custo-benefício, seja a combinação capaz de gerar maiores taxas de apoptose, necrose moderada, em conjunto a uma significante redução da proliferação da linhagem A431.



Figura 64. Estudo da proliferação da linhagem A431, após as diferentes combinações de tratamentos, por citometria de fluxo utilizando ki-67 marcado com Alexa 647. Análises estatísticas foram avaliadas utilizando Two-Way ANOVA, 95% de confiança, Tukey teste, n=4 para cada tratamento. As letras representam igualdade estatística.

4.11. Atividade antitumoral in vivo

A seleção da combinação multifuncional para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* deu-se ao longo dos experimentos *in vitro*. Estes experimentos *in vitro* pré-clínicos de triagem, apontaram que a combinação multifuncional CLN 5-FU + siRNA Bcl-2 como a combinação mais adequada para experimentação *in vivo*, visto a efetividade deste tratamento no que diz respeito a redução da migração, redução de padrão de invasividade, aumento da sinalização de morte celular por apoptose, com necrose controlada, associada a redução da proliferação.

A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada utilizando modelo de Xenotransplante onde os diversos tratamentos foram aplicados topicamente durante 15 dias (Figura 65). Neste estudo *in vivo*, a relação do 5-FU com a apoptose foi combinada ao siRNA específico para Bcl-2, de modo a intensificar a morte celular das células tumorais por apoptose. Entretanto, no microambiente tumoral ocorrem eventos necróticos e inflamatórios, e o estudo destes são imprescindíveis para compreensão dos mecanismos que ocorrem no interior tumoral, desta forma foram contemplados neste estudo.



Figura 65. Esquema das etapas do experimento in vivo, sendo que ao final todos os tumores, dos animais dos grupos experimentais, foram excisados e estudados em aspectos macroscópicos e histológicos, bem como análises de infiltrados inflamatórios, proteína Bcl-2, citocinas, apoptose, produção de tecido fibroso.

A Figura 66 mostra o monitoramento do peso dos animais e volume tumoral durante todo o tempo de tratamento de modo a se avaliar a capacidade do nanossistema desenvolvido em reduzir o volume tumoral.

Denominou-se dia zero (D0) o dia na qual as células tumorais foram injetadas no dorso dos animais, e dia um (D1) o primeiro dia de tratamento, na qual os tumores alcançaram o volume de 120±20 mm³. Pode-se notar que, apenas para o grupo de tratamento com o creme comercial, a média dos pesos dos animais reduziu-se com o tempo, isso deve-se ao fato de o 5-FU ser um fármaco com alto potencial de efeitos adversos sistêmicos. Devido ao fato de o produto comercial se tratar de um creme, uma forma farmacêutica convencional, onde não há liberação controlada do fármaco, a perda de peso foi considerada um efeito adverso sistêmico, relacionado à uma absorção sistêmica de 5-FU através da pele. Associadas à perda de peso, neste grupo de estudo também se constatou outro evento adverso importante, caracterizado por erupções cutâneas predominantes em todos os animais do grupo. Estudos de caso reportaram efeitos adversos relacionados a 5-FU tópico, tais como erupções

cutâneas, letargia, fadiga, perdas de pesos significativas podendo chegar a casos de anorexia (CHUGHTAI et al., 2017; KISHI; PRICE, 2018).



Figura 66. Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* após 15 dias de tratamento tópico onde avaliou-se (A) o peso dos animais, (B) o volume tumoral bem como o (C) peso dos tumores após eutanásia dos animais, e a (D) análise do crescimento tumoral médio durante todo o tratamento. Análises estatística foram realizadas através de Two-way ANOVA, 95% de confiança, Tukey's Test.

Em relação ao volume e peso tumoral, os dois grupos do estudo onde observou-se significativa redução de ambos foram CLN contendo o siRNA Bcl-2 e o CLN multifuncional, contendo ambos, 5-FU e siRNA Bcl-2. No entanto, em relação ao volume tumoral houve diferença estatística entre estes grupos (p<0,05), sendo o CLN multifuncional o tratamento onde alcançou-se o menor volume tumoral. Este tratamento multifuncional apresentou, durante os 15 dias de tratamento, a menor mediana de crescimento tumoral, sendo próxima a zero, o que indica que o crescimento tumoral estagnou durante a maior parte do tempo de tratamento, apresentando ainda, momentos de redução de volume tumoral significativa. Atribui-se essa estagnação do crescimento tumoral ao efeito sinérgico entre o fármaco e o siRNA, atuando em conjunto liberando processos apoptóticos e impedindo a replicação celular.

Como já é de conhecimento, no microambiente tumoral há recrutamento de células inflamatórias constantemente e nos centros tumorais há alta incidência de necrose, pois as células passam por alta privação de oxigênio. A consequência da via necrótica é o alto número de células inflamatórias na região, para fagocitose do material celular. A apoptose por sua vez, ocorre naturalmente esporadicamente, pois na maioria dos casos, as células tumorais expressam inúmeros sinalizadores anti-apoptóticos bem como há a superexpressão de moléculas anti-apoptóticas. As duas formas dominantes de morte celular, apoptose e necrose, foram observadas neste estudo, de modo que a organização da via apoptose e seus menores efeitos imunológicos, com uma menor intensidade de recrutamento de células imunes e inflamatórias foi observado; em contrapartida a necrose, uma morte celular com alta incidência de infiltrados inflamatórios e exsudatos proteicos também foi evidenciada (CHEN; KANG; FU, 2018; D'ARCY, 2019).

A família das proteínas Bcl-2 já é amplamente conhecida pelo seu importante papel nos mecanismos de resistência e morte celular por apoptose dos diversos tipos de câncer. Essa família de proteínas tem sido amplamente estudada de modo que se consiga suprimir a superexpressão de alguns membros anti-apoptóticos, tais como Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 e ao mesmo tempo elevar os níveis dos membros pró-apoptóticos, como BAX, BAK. Essas proteínas tem sido alvo de estudos para desenho de novos fármacos, novos inibidores, e no uso de moléculas inibidoras tais como os siRNAs (BASU, 2021; HAFEZI; RAHMANI, 2021; KRISHNA et al., 2021).

De acordo com a complexidade do ambiente tumoral, não bastaria identificar apenas os alvos do estudo, por isso associado ao estudo de morte celular, a inflamação dá-se como uma importante ferramenta para melhor compreender os eventos que ocorrem no interior tumoral. O uso de marcadores e moléculas expressas são utilizados nos estudos de determinação da presença de infiltrados inflamatórios, e pode-se mencionar as mieloperoxidases (MPO) como a marcação mais utilizada na determinação de infiltrados por neutrófilos, assim como a N-acetilglucosamina (NAG) é um importante indicador de macrófagos.

Em relação a citocinas presentes, pode-se destacar Fator de necrose tumoral alpha (TNF-α) uma das mais importante no microambiente tumoral. O TNF-α possui uma relação de pleiotropia com o câncer de pele, ou seja, está relacionado a diversos eventos possuindo múltiplas funções, muitas vezes

163

inversas. Ao mesmo tempo que altos níveis de TNF-α induz a morte de células cancerosas, o TNF-α também está envolvido na carcinogênese associada à inflamação por meio do apoio ao crescimento, sobrevivência, diferenciação, invasão, metástases e subversão das respostas imunológicas das células tumorais (GHAHARTARS et al., 2021). Por este motivo, alterações drásticas nos níveis desta citocina podem ser maléficas ou benéficas. Já existem estudos que apontam que pacientes que fazem o uso de antagonistas de TNF-α possuem risco aumentado de desenvolverem câncer de pele (WANG et al., 2020a), e ao mesmo tempo, pacientes com câncer de pele precisam controlar os níveis de TNF- α , pois esta citocina aumentada pode desencadear metástases (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016; SASI et al., 2014).

A literatura menciona a relação de altos níveis de TNF-α com resistência ao 5-FU, onde fármacos antagonistas a TNF-α são utilizados para que a ação antimetabólica de 5-FU seja efetiva. Desta forma, quando os níveis dessa citocina reduz pode-se observar com clareza a ação do 5-FU na morte celular, particularmente na apoptose (LIU et al., 2016).

Essa relação da capacidade de TNF- α alterar a apoptose mediada por 5-FU foi estudada de modo a utilizar este mecanismo para gerar morte das células tumorais por necroptose. Necroptose é uma morte celular proveniente na necrose, porém, com mecanismos programados assim como a apoptose. Acredita-se que este tipo de via para a morte celular possa ser uma alternativa a células que possuem resistência à apoptose. Desta forma, altos níveis de TNF- α podem ocasionar mortes celulares induzidas por 5-FU via necroptose e não por apoptose (CHEN; KANG; FU, 2018; METZIG et al., 2016).

Na Figura 67 pode-se observar que a presença de indicadores inflamatórios, MPO e NAG, indicando infiltrados inflamatórios presentes em todos os grupos do estudo *in vivo*, porém para MPO (Figura 67-A) houve um significante aumento nos grupos 5-FU em solução e para o grupo tratado com o creme comercial, sendo que para este último, também se observou significativo aumento de NAG (Figura 67-B). Desta forma sugere-se que o creme comercial, conforme observado macroscopicamente, causa intenso recrutamento de células inflamatórias para a massa tumoral. Em contraste, os grupos que apresentaram menores porções de MPO e NAG foram o CLN contendo siRNA Bcl-2 e o CLN multifuncional, porém há diferença estatística entre estes, sendo

o tratamento com o nanossistema multifuncional aquele que apresentou o menor recrutamento de células inflamatórias para o interior tumoral.

Já se estabeleceu na literatura uma relação entre a expressão de MPO e NAG com o prognóstico e inclusive já foi reportado o papel destes indicadores com a patogênese do câncer de pele não melanoma.

A inflamação que ocorre devido ao crescimento tumoral é um evento considerado natural no microambiente tumoral, porém guando este evento inflamatório se torna por algum motivo exacerbado, pode-se correlacionar com piores prognósticos, relacionando intensos infiltrados inflamatórios a eventos de dano ao DNA das células. Este dano ao DNA ocorre devido ao edema que se instala, altas infiltrações de neutrófilos, que culminam em alta secreção de citocinas pró inflamatórias bem como espécies reativas de oxigênio. Associado a infiltração de neutrófilos, o recrutamento de macrófagos desencadeia alta produção do Fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), que representa uma citocina pró inflamatória associada fortemente com tumorigênese. Existem relatos na literatura que MIF se encontra aumentado em casos agressivos de diversos tipos de câncer de pele, tanto não melanoma como melanoma. No entanto, também existem trabalhos da literatura que mostram, para outros tipos de câncer, que aumentos de MPO indicam melhor taxa de sobrevivência global, e isso está associado ao auxílios das células inflamatórias no combate às células tumorais (MARTIN et al., 2009; ZEINDLER et al., 2019).

Baseado nos dados da literatura e nos resultados obtidos da quantificação tumoral tanto da proteína Bcl-2 (Figura 67-C) quanto de TNF- α (Figura 67-D), pode-se observar que a alta concentração de TNF- α não permitiu que a ação do 5-FU fosse efetiva causando morte celular por apoptose, e que nos tratamentos onde o siRNA Bcl-2 estava presente observou-se um decréscimo tanto da proteína alvo como de TNF- α , evidenciando o auxílio do siRNA na ação do fármaco.

No tratamento CLN multifuncional a inibição da proteína Bcl-2 foi efetiva, sendo em torno de 10 vezes menor que o grupo controle, e os níveis de TNF-α também foram altamente reduzidos em relação aos grupos onde há 5-FU sozinho, mostrando claramente o auxílio do siRNA na ação de 5-FU. Sugere-se então, que a morte das células tumorais no grupo CLN multifuncional tenham ocorrido por apoptose e necrose, porém a via necroptose é uma possibilidade.

Já no grupo CLN 5-FU, o alto nível da citocina TNF-α sugere que a morte das células tumorais possa ter ocorrido por necrose e necroptose, sendo uma minoria apoptose. No entanto, os níveis de TNF-α baixos no tratamento CLN Bcl-2, deixa clara a dominância de morte das células tumorais via apoptose e não por necrose neste grupo de estudo.



Figura 67. Quantificação tumoral de indicadores de atividade imunológica sendo (A) mieloperoxidases (MPO) indicativos de presença de neutrófilos e (B) n-acetilglucosamina (NAG) indicativo da presença de macrófagos, bem como quantificação através de ELISA da proteína (C) Bcl-2 e de (D)TNF-α. Análises estatística foram realizadas através de Two-Way ANOVA, Teste de Tukey, 95% de confiança.

As observações mencionadas acima, a respeito dos achados inflamatórios, bem como observações de vias de morte celular deduzidas a partir da quantificação tanto da proteína Bcl-2 como de TNF-α puderam ser confirmadas através das análises histológicas dos tumores. Devido à aplicação dos tratamentos ser via tópica, o tecido cutâneo localizado acima dos tumores também foi coletado no momento da excisão tumoral e o mesmo também foi analisado histologicamente por HE (Figura 68), Tunel (Figura 69) e Tricômico de Masson (Figura 70).

Através da análise histológica do tecido cutâneo, observa-se em HE que todos os grupos do estudo, independente do tratamento, permaneceram após os 15 dias de tratamentos sem danos estruturais aparentes, exceto o grupo do creme comercial (Figura 68-E). Neste grupo pode-se identificar uma alta desorganização da derme papilar e reticular, além de alta desestruturação da junção dermoepidérmica.

No que diz respeito a apoptose, evidenciada pela coloração Tunel, nenhuma alteração foi observada em relação ao tecido saudável, bem como em Tricômico de Masson, nenhuma diferença entre os grupos se evidenciou no tecido cutâneo.



Figura 68. Análise histológica por HE do tecido cutâneo dos camundongos NU(Ico)-Foxn1^{nu} (A) Sadios, na qual não houve injeção das células A431, (B) Controle tumoral onde não foi realizado nenhum tratamento, e daqueles que receberam os seguintes tratamentos, (C) 5-FU em solução, (D) siRNA Bcl-2 livre, (E) Creme comercial (5% m/m 5-FU), (F) CLN controle, (G) CLN 5-FU, (H) CLN siRNA Bcl-2 e (I) CLN multifuncional (5-FU + siRNA Bcl-2). Destaca-se na imagem do tecido sadio as camadas da pele.

Em contrapartida, nos tecidos tumorais diversas observações podem ser feitas entre os grupos de estudo. Através da coloração HE (Figura 71) pode-se observar que estruturalmente os tumores são diferentes entre si, sendo que alguns grupos o tumor se apresentou de forma mais nodular, como por exemplo o grupo CLN siRNA Bcl-2 e CLN multifuncional. Em contraposição, os grupos 5-FU em solução e creme comercial os tumores apresentaram aspecto invasivo, não ficando evidente uma separação entre o tecido tumoral e os tecidos cutâneo e muscular dos animais.

No grupo controle fica evidente o aspecto nodular *in situ* não invasivo do tumor que se forma, tenso as células tumorais com citoplasma eosinófilico e núcleos volumosos, cromatina densa e nucléolos proeminentes. Existem diversas mitoses atípicas e presença de paraceratose e disceratose.



Figura 69. Análise histológica por Tunel do tecido cutâneo dos camundongos NU(Ico)-Foxn1^{nu} (A) Sadios, na qual não houve injeção das células A431, (B) Controle tumoral onde não foi realizado nenhum tratamento, e daqueles que receberam os seguintes tratamentos, (C) 5-FU em solução, (D) siRNA Bcl-2 livre, (E) Creme comercial (5% m/m 5-FU), (F) CLN controle, (G) CLN 5-FU, (H) CLN siRNA Bcl-2 e (I) CLN multifuncional (5-FU + siRNA Bcl-2). Destaca-se na imagem do tecido sadio as camadas da pele.

Ainda no grupo controle, há intensa reação inflamatória mononuclear permeando células tumorais com sinais de atipia nuclear, bem como regiões de necrose com pequenos abcessos e infiltrados ao redor de vasos. O grupo 5-FU em solução (Figura 71-B) por sua vez, apresenta as características mencionadas acima, porém com acréscimos de regiões necróticas e mitoses atípicas. E os

grupos siRNA Bcl-2 livre (Figura 71-C) e CLN controle (Figura 71-E) apresentam as mesmas características que o grupo controle.

O grupo de tratamento creme comercial (Figura 71-D) por sua vez, apresentou regiões de necrose caseosa intensa, com infiltrados inflamatórios ao redor bem como a presença de angiogênese e sinais de invasão tecidual. Neste grupo, pouco se evidencia a divisão entre o tumor e os tecidos ao redor. As células tumorais nestes grupos de tratamento se apresentam com núcleos em forma alongada imersas em estroma fibrilar.

Os grupos CLN 5-FU (Figura 71-F e Figura 71-G), CLN Bcl-2 (Figura 71-H e Figura 71-I) e CLN multifuncional (Figura 71-J e Figura 71-L) podem-se observar regiões de infiltrados inflamatórios e regiões de necrose e aparente apoptose, porém apenas para CLN 5-FU observa-se angiogênese. Ambos os grupos possuem tumor nodular, porém nos grupos CLN Bcl-2 CLN multifuncional é evidente o aspecto nodulocístico do tumor, soltando-se facilmente do tecido cutâneo que o cobre.



Figura 70. Análise histológica por Tricômico de Masson do tecido cutâneo dos camundongos NU(Ico)-Foxn1^{nu} (A) Sadios, na qual não houve injeção das células A431, (B) Controle tumoral onde não foi realizado nenhum tratamento, e daqueles que receberam os seguintes tratamentos, (C) 5-FU em solução, (D) siRNA Bcl-2 livre, (E) Creme comercial (5% m/m 5-FU), (F) CLN controle, (G)

CLN 5-FU, (H) CLN siRNA Bcl-2 e (I) CLN multifuncional (5-FU + siRNA Bcl-2). Destaca-se na imagem do tecido sadio as camadas da pele.

Estes três grupos possuem em comum a característica de tumores com bordas contendo infiltrados inflamatórios intensos circundando células tumorais viáveis com proliferação difusa apresentando núcleo pequeno, muitas vezes disforme, e amplo citoplasma entre feixes de colágeno, porém o interior tumoral é amplamente necrótico e apoptótico.

A hipótese de haver morte celular por apoptose foi investigada pela coloração específica Tunel. Nota-se discretos grupos apoptóticos (Figura 72) para o grupo controle, considerados normais em tumores sólidos, porém o aspecto apoptótico dos centros tumorais se confirma para os grupos com os tratamentos creme comercial, CLN 5-FU, CLN siRNA Bcl-2 e CLN multifuncional, sendo os dois últimos, os grupos que apresentam maior intensidade de grupos apoptóticos na extensão do tecido tumoral. As células apoptóticas caracterizam-se por núcleos castanhos/marrons marcados ao longo de todo o tecido tumoral.

Destaca-se que o grupo CLN controle (Figura 72-E) se apresentou sem marcação específica para apoptose, o que indica que o nanossistema por si só não é capaz de causar apoptose nas células tumorais. E assim como este grupo, a solução de 5-FU bem como o siRNA Bcl-2 livre não foram capazes de causar apoptose.

No que diz respeito à composição tumoral, notou-se em HE a incorporação de fibras elásticas com características de colágeno em alguns tumores de alguns grupos de tratamento, e essa presença de tecido fibroso foi avaliada especificamente por Tricômico de Masson (Figura 73).

Conforme estabelecido na literatura, já existe uma correlação entre a presença de tecido fibroso com vários tipos câncer, incluindo tumores cutâneos, onde a presença de fibras elásticas e colágeno estão relacionados a malignidade (BILLINGS; FOLPE, 2004). A presença destas fibras pode aumentar as chances de recorrência tumoral, bem como probabilidade de angiogênese que consequentemente se relaciona com chances de metástases aumentadas. Essas fibras surgem a partir do momento onde há intenso infiltrado inflamatório de modo que processos imunes e de fagocitose deixam escapar exsudatos proteicos e ou provocam que as células tumorais se diferenciem no tecido tumoral mimetizando células de tecido conjuntivo como fibroblastos (HENKE; NANDIGAMA; ERGÜN, 2020; WINKLER et al., 2020).



Tumor nodular

Figura 71. Análise histologia por HE dos tecidos tumorais dos animas dos grupos (A) Controle tumoral onde não foi realizado nenhum tratamento, ressaltando a borda tumoral e região e necrose no interior do tumor e também evidenciando regiões de infiltrados inflamatórios; (B) 5-FU em solução; (C) siRNA Bcl-2 livre; (D) Creme comercial (5% m/m 5-FU); (E) CLN controle; (F) CLN 5-FU, ressaltando intensa região de necrose e (G) ressaltando também angiogênese tumoral; (H) CLN siRNA Bcl-2, com foco na borda nodular tumoral e (H) regiões de infiltrados inflamatórios; (J) CLN multifuncional (5-FU + siRNA Bcl-2), destacando aspecto nodular do tumor bem como (L) seu centro necrótico/ apoptótico.



Figura 72. Análise histologia por Tunel dos tecidos tumorais dos animas dos grupos (A) Controle tumoral; (B) 5-FU em solução; (C) siRNA Bcl-2 livre; (D) Creme comercial (5% m/m 5-FU); (E) CLN controle; (F) CLN 5-FU, (G) CLN siRNA Bcl-2; (H) CLN multifuncional (5-FU + siRNA Bcl-2).

Uma das principais células envolvidas com a fibrose são os fibroblastos, e estes são responsáveis pela homeostase da matriz extracelular (MEC). Durante um processo patológico, os fibroblastos se tornam "ativados" e são os principais produtores de colágeno. Estes fibroblastos associados ao câncer possuem um perfil de expressão único e contribuem para a fibrose relacionada ao câncer. Desta forma, os fibroblastos associados ao câncer aumentaram sua capacidade de sinalização autócrina e tendências de proliferação, produzem proteínas da MEC dentro do microambiente tumoral, alterando drasticamente as propriedades do estroma tumoral, facilitando seu desenvolvimento e invasão da vizinhança tecidual (CHANDLER et al., 2019). As células tumorais buscam, ao longo se sua replicação, se instalarem naquele tecido de origem de modo a conseguirem progredir. A relação destas células com a MEC é de extrema importância para garantir que o tumor continue crescendo e se desenvolvendo e as interações entre as células tumorais e a MEC são essenciais para que o tumor continue progredindo ao passo de criar seus próprios vasos sanguíneos para fornecer aporte adequado de oxigênio bem como energia, conseguir adentrar tecidos vizinhos e desta forma conseguir causar metástase. De acordo com a progressão tumoral este cria um microambiente adequado para sua própria manutenção, conseguindo então remodelar a MEC. Essas mudanças impulsionadas pelo tumor apoiam o seu próprio crescimento, aumentam a

migração de células tumorais e a capacidade de remodelar a MEC em órgãos distantes permitem a progressão metastática (COX; ERLER, 2014; PIERSMA; HAYWARD; WEAVER, 2020; WINKLER et al., 2020).

No grupo controle (Figura 73-A) fica evidente a presença de fibras elásticas em toda a extensão tumoral bem como angiogênese, e nos grupos 5-FU em solução (Figura 73-B), siRNA Bcl-2 livre (Figura 73-C) e CLN controle (Figura 73-E) pode-se observar essas mesmas fibras circundando regiões com alta densidade de células inflamatórias, porém o grupo tratado com creme comercial (Figura 73-D) não possui esse tecido conjuntivo em seu interior, apenas uma fina camada mucosa nas bordas tumorais. Para os grupos CLN 5-FU (Figura 73-F), CLN siRNA Bcl-2 (Figura 73-G) e CLN multifuncional (Figura 73-H) a camada mucosa circundante ao tumor é mais espessa que no grupo do creme comercial, mas não há evidência de fibras elásticas e colágenas no interior tumoral.



Figura 73. Análise histologia por Tricômico de Masson dos tecidos tumorais dos animas dos grupos (A) Controle tumoral; (B) 5-FU em solução; (C) siRNA Bcl-2 livre; (D) Creme comercial (5% m/m 5-FU); (E) CLN controle; (F) CLN 5-FU, (G) CLN siRNA Bcl-2; (H) CLN multifuncional (5-FU + siRNA Bcl-2).

Tendo isso em mente, pode-se sugerir que os tratamentos nas quais apresentaram-se positivos para apoptose bem como não apresentaram tecido fibroso em seu interior, possam se tratar de opções de tratamentos nos quais conseguem inibir a remodelação da MEC, proporcionando então uma redução tumoral acompanhada de redução de chances de invasão tumoral e metástases (HENKE; NANDIGAMA; ERGÜN, 2020; PIERSMA; HAYWARD; WEAVER, 2020).

Conclusão

Diante do desenvolvimento bem como estudos iniciais de escalonamento conclui-se que, conforme apontado na literatura, os sistemas lipídicos baseados em sistemas sólidos, são de fácil escalonamento. Além disso, foi possível alcançar uma otimização adequada para trabalhar com o sistema desenvolvido em administração tópica, onde o sistema nanométrico foi capaz encapsular o fármaco 5-FU, e entrega-lo no tecido cutâneo, majoritariamente na epiderme. O CLN ainda se complexa eficientemente com os siRNAs específicos, bem como é capaz de libera-los sem causar danos.

No que diz respeito a sua performance no tecido, tanto em plataforma *in vitro* como *ex vivo*, pode-se observar que o sistema é capaz de reter-se sem comprometer a viabilidade tecidual, e possivelmente causa efeito protetor cutâneo, devido a formação de filme lipídico.

Sugere-se que o CLN com as diversas combinações multifuncionais possua características pouco tóxicas, porém capaz de afetar a viabilidade de linhagens celulares tumorais quando combinações das moléculas ativas são realizadas. A porcentagem de transfecção celular em plataforma 2D e 3D são condizentes com a literatura e também pode-se concluir que o nanosistema se internaliza majoritariamente pela via endocítica mediada por clatrina.

As combinações multifuncionais se mostraram promissoras no que diz respeito a redução da migração tumoral e processos de invasão, foram capazes de induzir apoptose, com processos de necrose controlada e algumas combinações conseguem afetar significativamente a proliferação.

Deste modo o CLN multifuncional baseado na combinação do 5-FU com o siRNA Bcl-2 foi testado *in vivo* quanto ao seu efeito antitumoral, e obteve-se redução tumoral associada a alta taxa de apoptose, bem como menores sinais de capacidade invasiva.

Sugere-se que o CLN multifuncional seja uma importante opção de tratamento tópico para tumores de pele, devido não só fato de reduzir o volume tumoral sem alterar a qualidade de vida do animal, mas também por este ter se apresentado como um tratamento inerte ao tecido cutâneo, não causando problemas estruturais no tecido, bem como sinalizando efetiva apoptose tumoral, infiltração inflamatória controlada e negatividade para remodelação da MEC.

Referências

ABU ABED, Omar S. Gene therapy avenues and COVID-19 vaccines. **Genes** and Immunity, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 120–124, 2021. DOI: 10.1038/s41435-021-00136-6. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41435-021-00136-6.

ADITYA, N. P.; ADITYA, Sheetal; YANG, Hanjoo; WON, Hye; OOK, Sung; KO, Sanghoon. Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. **FOOD CHEMISTRY**, *[S. l.]*, v. 173, p. 7–13, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.131. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.131.

ALDAGHI, Seyyede Araste; JALAL, Razieh. Concentration-Dependent Dual Effects of Ciprofloxacin on SB-590885-Resistant BRAF V600E A375 Melanoma Cells. **Chemical Research in Toxicology**, *[S. I.]*, v. 32, n. 4, p. 645–658, 2019. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.8b00335.

ALMEIDA, Vitor M.; BEZERRA JR., Maximino Alencar; NASCIMENTO, Jéssica C.; AMORIM, Lidia Maria F. Anticancer drug screening: standardization of in vitro wound healing assay. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, *[S. l.]*, v. 55, n. 6, p. 606–612, 2019. DOI: 10.5935/1676-2444.20190054.

ALVES-FERNANDES, D. K.; PENNACCHI, P. C.; SANDRI, S.; VICENTE, Alsa; VAZQUEZ, V. L.; REIS, R. M. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. **Nature Publishing Group**, *[S. I.]*, v. 36, n. 13, p. 1849–1861, 2016. DOI: 10.1038/onc.2016.348. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.348.

AMARAL, Robson L. F.; MIRANDA, Mariza; MARCATO, Priscyla D.; SWIECH, Kamilla. Comparative analysis of 3D bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. **Frontiers in Physiology**, *[S. l.]*, v. 8, n. AUG, 2017. DOI: 10.3389/fphys.2017.00605.

AMASYA, Gulin; AKSU, Buket; BADILLI, Ulya; ONAY-BESIKCI, Arzu; TARIMCI, Nilufer. QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. I.]*, v. 563, n. November 2018, p. 110–121, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.056.

AMERICAN CANCER SOCIETY. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2021. Atlanta, Ga: American Cancer Society, [S. I.], p. 13–15, 2021.

ANDERSON, Robin L. et al. A framework for the development of effective antimetastatic agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, *[S. l.]*, v. 16, n. 3, p. 185– 204, 2019. DOI: 10.1038/s41571-018-0134-8. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0134-8.

ANDRADE, Thiago Antônio Moretti; MASSON-MEYERS, Daniela Santos; CAETANO, Guilherme Ferreira; TERRA, Vânia Aparecida; OVIDIO, Paula Payão; JORDÃO-JÚNIOR, Alceu Afonso; FRADE, Marco Andrey Cipriani. Skin changes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, *[S. l.]*, v. 490, n. 4, p. 1154–1161, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.166. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.166.

ANG, Melgious Jin Yan; CHAN, Siew Yin; GOH, Yi Yiing; LUO, Zichao; LAU, Jun

Wei; LIU, Xiaogang. Emerging strategies in developing multifunctional nanomaterials for cancer nanotheranostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[S. l.]*, v. 178, p. 113907, 2021. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113907. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113907.

ANGELOVA, Magdalena; ORTIZ-MEOZ, Rodrigo F.; WALKER, Suzanne; KNIPE, David M. Inhibition of O-Linked *N* -Acetylglucosamine Transferase Reduces Replication of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. **Journal of Virology**, *[S. l.]*, v. 89, n. 16, p. 8474–8483, 2015. DOI: 10.1128/JVI.01002-15. Disponível em: http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.01002-15.

APALLA, Z.; CALZAVARA-PINTON, P.; LALLAS, A.; ARGENZIANO, G.; KYRGIDIS, A.; CROTTI, S.; FACCHETTI, F.; MONARI, P.; GUALDI, G. Histopathological study of perilesional skin in patients diagnosed with nonmelanoma skin cancer. **Clinical and Experimental Dermatology**, *[S. l.]*, v. 41, n. 1, p. 21–25, 2016. DOI: 10.1111/ced.12713.

APALLA, Zoe; NASHAN, Dorothée; WELLER, Richard B.; CASTELLSAGUÉ, Xavier. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. **Dermatology and therapy**, *[S. l.]*, v. 7, n. Suppl 1, p. 5–19, 2017. DOI: 10.1007/s13555-016-0165-y.

BADEA, Ildiko. New strategies in melanoma therapy: can nanoparticles overcome chemoresistance? **Nanomedicine**, *[S. l.]*, v. 12, n. 14, p. 1623–1626, 2017. DOI: 10.2217/nnm-2017-0145.

BAKER, Matthew J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, *[S. l.]*, v. 9, n. 8, p. 1771–1791, 2014. DOI: 10.1038/nprot.2014.110.

BAROLI, Biancamaria. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, *[S. l.]*, v. 99, n. 1, p. 21–50, 2010. DOI: 10.1002/jps.21817.

BASU, Alakananda. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, *[S. I.]*, n. xxxx, p. 107943, 2021. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107943. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107943.

BAULETH-RAMOS, Tomás et al. Colorectal cancer triple co-culture spheroid model to assess the biocompatibility and anticancer properties of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, *[S. I.]*, v. 323, n. December 2019, p. 398–411, 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.04.025. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.025.

BELTRÁN HERNÁNDEZ, Irati; ROMPEN, Rene; ROSSIN, Raffaella; XENAKI, Katerina T.; KATRUKHA, Eugene A.; NICOLAY, Klaas; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, Paul; GRÜLL, Holger; OLIVEIRA, Sabrina. Imaging of Tumor Spheroids, Dual-Isotope SPECT, and Autoradiographic Analysis to Assess the Tumor Uptake and Distribution of Different Nanobodies. **Molecular Imaging and Biology**, *[S. I.]*, v. 21, n. 6, p. 1079–1088, 2019. DOI: 10.1007/s11307-019-01320-x.

BENÍTEZ, José María; MONTÁNS, Francisco Javier. The mechanical behavior of skin: Structures and models for the finite element analysis. **Computers and Structures**, *[S. I.]*, v. 190, p. 75–107, 2017. DOI: 10.1016/j.compstruc.2017.05.003.

BENNETT, C. Frank; SWAYZE, Eric E. RNA Targeting Therapeutics : Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. **Anual Review of Pharmacology and Toxicology**, *[S. l.]*, v. 50, n. 1, p. 259–295, 2010. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654.

BERBER, Burak et al. Gene editing and RNAi approaches for COVID-19 diagnostics and therapeutics. **Gene Therapy**, *[S. l.]*, v. 28, n. 6, p. 290–305, 2021. DOI: 10.1038/s41434-020-00209-7. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41434-020-00209-7.

BERTON-CARABIN, Claire C. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *[S. I.]*, v. 13, p. 945–977, 2014. DOI: 10.1111/1541-4337.12097.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, *[S. l.]*, v. 235, p. 337–351, 2016. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017.

BILLINGS, Steven D.; FOLPE, Andrew L. Cutaneous and Subcutaneous Fibrohistiocytic Tumors of Intermediate Malignancy: An Update. **American Journal of Dermatopathology**, *[S. l.]*, v. 26, n. 2, p. 141–155, 2004. DOI: 10.1097/00000372-200404000-00035.

BORGHETI-CARDOSO, Livia Neves; VIEGAS, Juliana Santos Rosa; SILVESTRINI, Ana Vitoria Pupo; CARON, Angelo Luis; PRAÇA, Fabiola Garcia; KRAVICZ, Marcelo; BENTLEY, Maria Vitória Lopes Badra. Nanotechnology approaches in the current therapy of skin cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[S. I.]*, v. 135, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.02.005.

BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, *[S. l.]*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.

CAMERON, Michael C.; LEE, Erica; HIBLER, Brian P.; BARKER, Christopher A.; MORI, Shoko; CORDOVA, Miguel; NEHAL, Kishwer S.; ROSSI, Anthony M. Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. Journal of the American Academy of Dermatology, [S. ٧. 80, n. 2, p. 303-317, 2019. DOI: 1.1, 10.1016/j.jaad.2018.03.060.

CARBONE, Claudia; TEIXEIRA, Maria Do Céu; SOUSA, Maria Do Céu; MARTINS-GOMES, Carlos; SILVA, Amelia M.; SOUTO, Eliana Maria Barbosa; MUSUMECI, Teresa. Clotrimazole-loaded mediterranean essential oils NLC: A synergic treatment of Candida skin infections. **Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 11, n. 5, 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11050231.
CASAS, Bárbara S. et al. Downregulation of the Sonic Hedgehog / Gli pathway transcriptional target Neogenin-1 is associated with basal cell carcinoma aggressiveness. *[S. I.]*, v. 8, n. 48, p. 84006–84018, 2017.

CHAMBERS, Emma S.; VUKMANOVIC-STEJIC, Milica. Skin barrier immunity and ageing. **Immunology**, *[S. l.]*, v. 160, n. 2, p. 116–125, 2020. DOI: 10.1111/imm.13152.

CHANDLER, Chelsea; LIU, Tianshi; BUCKANOVICH, Ronald; COFFMAN, Lan G. The double edge sword of fibrosis in cancer. **Translational Research**, *[S. I.]*, v. 209, p. 55–67, 2019. DOI: 10.1016/j.trsl.2019.02.006.

CHAULAGAIN, Bivek; JAIN, Ankit; TIWARI, Ankita; VERMA, Amit; JAIN, Sanjay K. Passive delivery of protein drugs through transdermal route. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, *[S. l.]*, v. 46, n. sup1, p. 472–487, 2018. DOI: 10.1080/21691401.2018.1430695. Disponível em: https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1430695.

CHEN, Fei et al. Clathrin-mediated endocytosis is a candidate entry sorting mechanism for Bombyx mori cypovirus. **Scientific Reports**, *[S. l.]*, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-25677-1.

CHEN, Qi; KANG, Jian; FU, Caiyun. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, *[S. I.]*, v. 3, n. 1, 2018. DOI: 10.1038/s41392-018-0018-5. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41392-018-0018-5.

CHERY, Jessica. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. **Postdoc J.**, *[S. I.]*, v. 4, n. 7, p. 35–50, 2016.

CHO, Kwangjae; WANG, Xu; NIE, Shuming; CHEN, Zhuo; SHIN, Dong M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, *[S. I.]*, v. 14, n. 5, p. 1310–1316, 2008. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1441.

CHUGHTAI, Komal; GUPTA, Rahul; UPADHAYA, Sunil; AL HADIDI, Samer. Topical 5-Fluorouracil associated skin reaction. **Oxford Medical Case Reports**, *[S. l.]*, v. 2017, n. 8, p. 145–146, 2017. DOI: 10.1093/omcr/omx043.

CORCIONE, Carola Esposito; FRIGIONE, Mariaenrica. Characterization of Nanocomposites by Thermal Analysis. *[S. l.]*, p. 2960–2980, 2012. DOI: 10.3390/ma5122960.

COX, Thomas R.; ERLER, Janine T. Molecular pathways: Connecting fibrosis and solid tumor metastasis. **Clinical Cancer Research**, *[S. l.]*, v. 20, n. 14, p. 3637–3643, 2014. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1059.

CRUZ, Letícia; SOARES, Leonardo U.; COSTA, Teresa Dalla; MEZZALIRA, Graziela; DA SILVEIRA, Nadya P.; GUTERRES, Sílvia S.; POHLMANN, Adriana R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 313, n. 1–2, p. 198–205, 2006. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.01.035.

D'ARCY, Mark S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, *[S. l.]*, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.

DOI: 10.1002/cbin.11137. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137.

DĄBROWSKA, A. K.; ROSSI, R. M. The relationship between skin function, barrier properties, and body- - dependent factors. *[S. l.]*, n. September 2017, p. 165–174, 2018. DOI: 10.1111/srt.12424.

DELGADO-CHARRO, M. Begoña; IGLESIAS-VILAS, Graciela; BLANCO-MÉNDEZ, José; LÓPEZ-QUINTELA, M. Arturo; MARTY, Jean Paul; GUY, Richard H. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, *[S. I.]*, v. 43, n. 1, p. 37–42, 1997. DOI: 10.1016/S0939-6411(96)00016-1.

DELHOVE, Juliette; OSENK, Ivana; PRICHARD, Ivanka; DONNELLEY, Martin. Public Acceptability of Gene Therapy and Gene Editing for Human Use: A Systematic Review. **Human Gene Therapy**, *[S. I.]*, v. 31, n. 1–2, p. 20–46, 2020. DOI: 10.1089/hum.2019.197.

DIDONA, Dario; PAOLINO, Giovanni; BOTTONI, Ugo; CANTISANI, Carmen. Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. **Biomedicines**, *[S. l.]*, v. 6, n. 1, p. 6, 2018. DOI: 10.3390/biomedicines6010006. Disponível em: http://www.mdpi.com/2227-9059/6/1/6.

DONAHUE, Nathan D.; ACAR, Handan; WILHELM, Stefan. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[S. l.]*, v. 143, p. 68–96, 2019. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008.

DORRANI, Mania; GARBUZENKO, Olga B.; MINKO, Tamara; MICHNIAK-KOHN, Bozena. Development of edge-activated liposomes for siRNA delivery to human basal epidermis for melanoma therapy. **Journal of Controlled Release**, *[S. l.]*, v. 228, p. 150–158, 2016. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.03.010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.010.

DOS REIS, Samara Bonesso et al. Mechanistic insights into the intracellular release of doxorubicin from pH-sensitive liposomes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, *[S. I.]*, v. 134, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110952.

DUAN, Xingmei; MU, Minjie; YAN, Junfeng; BAI, Lan; ZHONG, Lei; ZHU, Yuxuan; PAN, Haixia; ZHANG, Mei; SHI, Jianyou. Co-delivery of aurora-A inhibitor XY-4 and Bcl-xI siRNA enhances antitumor efficacy for melanoma therapy. **International Journal of Nanomedicine**, *[S. l.]*, v. 13, p. 1443–1456, 2018. DOI: 10.2147/IJN.S147759.

DUONG, Van An; NGUYEN, Thi Thao Linh; MAENG, Han Joo; CHI, Sang Cheol. Nanostructured lipid carriers containing ondansetron hydrochloride by cold highpressure homogenization method: Preparation, characterization. and Journal of Drug Delivery pharmacokinetic evaluation. Science and Technology, [S. 53, July, 101185, 2019. DOI: *I.*], v. n. р. 10.1016/j.jddst.2019.101185.

DURAKOVIC, Benjamin. Design of experiments application, concepts, examples: State of the art. **Periodicals of Engineering and Natural Sciences**, [S. I.], v. 5,

n. 3, p. 421–439, 2017. DOI: 10.21533/pen.v5i3.145.

DURYMANOV, Mikhail; REINEKE, Joshua. Non-viral Delivery of Nucleic Acids : Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers. **Frontiers in Pharmacology**, *[S. I.]*, v. 9, p. 1–15, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.00971.

DZMITRUK, Volha et al. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 485, n. 1–2, p. 288–294, 2015. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.03.034. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.034.

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

EH SUK, Vicit Rizal; MOHD. LATIF, Farhanim; TEO, Yin Yin; MISRAN, Misni. Development of nanostructured lipid carrier (NLC) assisted with polysorbate nonionic surfactants as a carrier for I-ascorbic acid and Gold Tri.E 30. **Journal of Food Science and Technology**, *[S. I.]*, v. 57, n. 9, p. 3259–3266, 2020. DOI: 10.1007/s13197-020-04357-x.

EMAMI, Jaber; REZAZADEH, Mahboubeh; SADEGHI, Hojjat; KHADIVAR, Khashayar. Development and optimization of transferrin-conjugated nanostructured lipid carriers for brain delivery of paclitaxel using Box–Behnken design. **Pharmaceutical Development and Technology**, *[S. l.]*, v. 22, n. 3, p. 370–382, 2017. DOI: 10.1080/10837450.2016.1189933. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/10837450.2016.1189933.

ESTEVA, Andre; KUPREL, Brett; NOVOA, Roberto A.; KO, Justin; SWETTER, Susan M.; BLAU, Helen M.; THRUN, Sebastian. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. **Nature**, *[S. l.]*, v. 542, n. 7639, p. 115–118, 2017. DOI: 10.1038/nature21056. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nature21056.

EVANS, David; POTOMAC, North; XU, Jun John. Compositions and Methods Using RNA molecules and siRNA Cocktals for The Treatment of Breast Cancer 2015.

FACTS, Cancer. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2019. Atlanta: American Cancer Society. *[S. I.]*, 2019.

FEOKTISTOVA, Maria; PANAYOTOVA-DIMITROVA, Diana. Overcoming cell death resistance in skin cancer therapy: Novel translational perspectives. **Experimental Dermatology**, *[S. I.]*, v. 26, n. 10, p. 854–857, 2017. DOI: 10.1111/exd.13309.

FERREIRA, André Duarte B. L.; NÓVOA, Paulo R. O.; MARQUES, António Torres. Multifunctional Material Systems : A state-of-the-art review. *[S. l.]*, v. 151, p. 3–35, 2016. DOI: 10.1016/j.compstruct.2016.01.028.

FESSAS, D.; SIGNORELLI, M.; SCHIRALDI, A.; KENNEDY, C. J.; WESS, T. J.; HASSEL, B.; NIELSEN, K. Thermal analysis on parchments I: DSC and TGA combined approach for heat damage assessment. *[S. l.]*, v. 447, p. 30–35, 2006. DOI: 10.1016/j.tca.2006.04.007.

FIRE, Andrew; XU, SiQun; MONTGOMERY, Mary K.; KOSTAS, Steven A.; MELLO, Samuel E.; DRIVER C., Craig. Potent and specific genetic interference by double-strandedRNAin Caenorhabditis elegans. **Nature**, *[S. l.]*, v. 391, p. 806–811, 1998.

FLORIN, Valerie; DESMEDT, Eve; VERCAMBRE-DARRAS, Sophie; MORTIER, Laurent. Topical treatment of cutaneous metastases of malignant melanoma using combined imiquimod and 5-fluorouracil. *[S. I.]*, p. 1641–1645, 2012. DOI: 10.1007/s10637-011-9717-2.

FOROOZANDEH, Parisa; AZIZ, Azlan Abdul. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, *[S. l.]*, v. 13, 2018. DOI: 10.1186/s11671-018-2728-6.

GANESAN, Poovi; NARAYANASAMY, Damodharan. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, *[S. I.]*, v. 6, n. July, p. 37–56, 2017. DOI: 10.1016/j.scp.2017.07.002.

GHAHARTARS, Mehdi; ABTAHI, Shabnam; ZEINALI, Zahra; FATTAHI, Mohammad Javad; GHADERI, Abbas. Investigation of tnf-α and il-6 levels in the sera of non-melanoma skin cancer patients. **Iranian Biomedical Journal**, *[S. l.]*, v. 25, n. 2, p. 88–92, 2021. DOI: 10.29252/ibj.25.2.88.

GOVERNO, Mariana; SANTOS, Mónica S. F.; ALVES, Arminda; MADEIRA, Luís M. Degradation of the cytostatic 5-Fluorouracil in water by Fenton and photoassisted oxidation processes. **Environmental Science and Pollution Research**, *[S. l.]*, p. 844–854, 2017. DOI: 10.1007/s11356-016-7827-2. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7827-2.

GRAHAM, Helen K.; ECKERSLEY, Alexander; OZOLS, Matiss; MELLODY, Kieran T.; SHERRATT, Michael J. Human Skin: Composition, Structure and Visualisation Methods. **Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials**, *[S. I.]*, v. 22, p. 1–18, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-13279-8_1.

GREEN, A. C.; OLSEN, C. M. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review. **British Journal of Dermatology**, *[S. l.]*, v. 177, n. 2, p. 373–381, 2017. DOI: 10.1111/bjd.15324.

GROSS, Alexander; NIEMETZ-RAHN, Annett; KEILHOLZ, Ulrich; FUSI, Alberto. Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway. *[S. l.]*, 2014. DOI: 10.1007/s11523-014-0318-9.

GU, Liyuan; SUN, Rui; WANG, Wenjuan; XIA, Qiang. Nanostructured lipid carriers for the encapsulation of phloretin: preparation and in vitro characterization studies. **Chemistry and Physics of Lipids**, *[S. l.]*, p. 105150, 2021. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2021.105150.

GUPTA, Akash; ANDRESEN, Jason L.; MANAN, Rajith S.; LANGER, Robert. Nucleic acid delivery for therapeutic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[S. l.]*, v. 178, p. 113834, 2021. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113834. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113834. GUPTA, Shweta; KESARLA, Rajesh; CHOTAI, Narendra; MISRA, Ambikanandan; OMRI, Abdelwahab. Systematic Approach for the Formulation and Optimization of Solid Lipid Nanoparticles of Efavirenz by High Pressure Homogenization Using Design of Experiments for Brain Targeting and Enhanced Bioavailability. *[S. I.]*, v. 2017, 2017.

HAFEZI, Shirin; RAHMANI, Mohamed. Targeting BCL-2 in Cancer: Advances, Challenges, and Perspectives. [S. I.], p. 1–15, 2021.

HÅKANSSON, Andreas. **Fabrication of Nanoemulsions by High-Pressure Valve Homogenization**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1016/B978-0-12-811838-2.00007-2.

HANNA, Johora; HOSSAIN, Gazi S.; KOCERHA, Jannet. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. **Frontiers in Genetics**, *[S. l.]*, v. 10, p. 1–6, 2019. DOI: 10.3389/fgene.2019.00478.

HANNUS, Michael; BEITZINGER, Michaela; ENGELMANN, Julia C.; WEICKERT, Marie-theresa; SPANG, Rainer; HANNUS, Stefan; MEISTER, Gunter. siPools : highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects. *[S. I.]*, v. 42, n. 12, p. 8049–8061, 2014. DOI: 10.1093/nar/gku480.

HEDBLAD, Mari Anne; MALLBRIS, Lotus. Grenz ray treatment of lentigo maligna and early lentigo maligna melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, *[S. l.]*, v. 67, n. 1, p. 60–68, 2012. DOI: 10.1016/j.jaad.2011.06.029.

HENKE, Erik; NANDIGAMA, Rajender; ERGÜN, Süleyman. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, *[S. l.]*, v. 6, n. January, p. 1–24, 2020. DOI: 10.3389/fmolb.2019.00160.

HIDAI, Chiaki; KITANO, Hisataka. Nonviral Gene Therapy for Cancer : A Review. **Diseases**, *[S. l.]*, v. 6, n. 57, p. 1–12, 2018. DOI: 10.3390/diseases6030057.

HUA, Ching; LEE, Regina; HUSSAIN, Khairunnisa Mohamed; CHU, Justin Jang Hann. Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, *[S. l.]*, v. 13, n. 8, p. 1–19, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007610.

HUANG, Juan; WANG, Qiang; LI, Tong; XIA, Nan; XIA, Qiang. Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. **Journal of Food Engineering**, *[S. l.]*, v. 215, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2017.07.002.

IHNATSYEU-KACHAN, Aliaksei et al. Multi-Target Inhibition of Cancer Cell Growth by SiRNA Cocktails and 5-Fluorouracil Using Effective Piperidine-Terminated Phosphorus Dendrimers. **Colloids and Interfaces**, *[S. l.]*, v. 1, n. 1, p. 6, 2017. DOI: 10.3390/colloids1010006. Disponível em: http://www.mdpi.com/2504-5377/1/1/6.

IONOV, Maksim et al. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells . Part (A). Mechanisms of interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. I.]*, v. 485, n. 1–2, p. 261–269, 2015. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.03.024. Disponível em:

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.024.

IQBAL, Babar; ALI, Javed; BABOOTA, Sanjula. Recent advances and development in epidermal and dermal drug deposition enhancement technology. **International Journal of Dermatology**, *[S. l.]*, v. 57, n. 6, p. 646–660, 2018. DOI: 10.1111/ijd.13902.

ITZIAR, G.; RODR, Julen; VICENTE-PASCUAL, M. Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives. **Nanomaterials**, *[S. l.]*, v. 10, n. 364, p. 1–42, 2020.

JENKINS, Russell W.; FISHER, David E. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. **Journal of Investigative Dermatology**, *[S. l.]*, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1016/j.jid.2020.03.943. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.03.943.

JIM DALEY. Gene Therapy Arrives. **Nature**, [S. I.], v. 576, p. 1–2, 2019.

JONKMAN, James E. N.; CATHCART, Judith A.; XU, Feng; BARTOLINI, Miria E.; AMON, Jennifer E.; STEVENS, Katarzyna M.; COLARUSSO, Pina. Cell Adhesion & Migration An introduction to the wound healing assay using livecell microscopy An introduction to the wound healing assay using livecell microscopy. **Cell adhesion and migration**, *[S. l.]*, v. 8, n. 5, p. 440–451, 2014. DOI: 10.4161/cam.36224.

JOSE, Anup; LABALA, Suman; NINAVE, Kunal Manoj; GADE, Sudeep Kumar; VENUGANTI, Venkata Vamsi Krishna. Effective Skin Cancer Treatment by Topical Co-delivery of Curcumin and STAT3 siRNA Using Cationic Liposomes. **AAPS PharmSciTech**, *[S. l.]*, v. 19, n. 1, p. 166–175, 2017. DOI: 10.1208/s12249-017-0833-y. Disponível em: http://link.springer.com/10.1208/s12249-017-0833-y.

KABIR, Soodeh; SCHMULTS, Chrysalyne D.; RUIZ, Emily S. A Review of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Epidemiology, Diagnosis, and Management. **International Journal of Cancer Management**, *[S. l.]*, v. In Press, n. In Press, p. 1–9, 2018. DOI: 10.5812/ijcm.60846.

KAFSHGARI, Morteza; HARDING, Frances; VOELCKER, Nicolas. Insights into Cellular Uptake of Nanoparticles. **Current Drug Delivery**, *[S. l.]*, v. 12, n. 1, p. 63–77, 2015. DOI: 10.2174/1567201811666140821110631.

KALLINI, Joseph R.; HAMED, Nouran; KHACHEMOUNE, Amor. Squamous cell carcinoma of the skin: Epidemiology, classification, management, and novel trends. **International Journal of Dermatology**, *[S. l.]*, v. 54, n. 2, p. 130–140, 2015. DOI: 10.1111/ijd.12553.

KALLIOLIAS, George D.; IVASHKIV, Lionel B. TNF biology, pathogenic therapeutic mechanisms and emerging strategies. Nature reviews Rheumatology, [S. *I.]*, v. 12, n. 1, p. 49–62, 2016. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.169.TNF.

KARAGIANNIS, Panagiotis; FITTALL, Matthew; KARAGIANNIS, Sophia N. Evaluating biomarkers in melanoma. **Frontiers in Oncology**, *[S. l.]*, v. 4, n. January, p. 1–11, 2015. DOI: 10.3389/fonc.2014.00383.

KARIM, Emranul; THA, Kyi Kyi; OTHMAN, lekhsan; UDDIN, Mohammad Borhan. Therapeutic Potency of Nanoformulations of siRNAs and shRNAs in Animal Models of Cancers. **Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 10, n. 65, p. 1–44, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020065.

KASONGO, Kasongo Wa; MÜLLER, Rainer H.; WALKER, Roderick B. The use of hot and cold high pressure homogenization to enhance the loading capacity and encapsulation efficiency of nanostructured lipid carriers for the hydrophilic antiretroviral drug, didanosine for potential administration to paediatric patients. **Pharmaceutical Development and Technology**, *[S. I.]*, v. 17, n. 3, p. 353–362, 2012. DOI: 10.3109/10837450.2010.542163.

KAUFFMANN, Rondi M.; CHEN, Steven L. Workup and Staging of Malignant Melanoma. **Surgical Clinics of North America**, *[S. l.]*, v. 94, n. 5, p. 963–972, 2014. DOI: 10.1016/j.suc.2014.07.001.

KAUVAR, Arielle N. B.; CRONIN, Terrence; ROENIGK, Randall; HRUZA, George; BENNETT, Richard. Consensus for nonmelanoma skin cancer treatment: Basal cell carcinoma, including a cost analysis of treatment methods. **Dermatologic Surgery**, *[S. l.]*, v. 41, n. 5, p. 550–571, 2015. DOI: 10.1097/DSS.00000000000296.

KHIDHIR, Ali Ghufran; HAMADI, Adel Sharif. Central Composite Design Method for the Preparation, Stability and Properties of Water-in-Diesel Nano Emulsions. **Advances in Chemical Engineering and Science**, *[S. I.]*, v. 08, n. 03, p. 176–189, 2018. DOI: 10.4236/aces.2018.83012.

KISHI, Patrick; PRICE, Cynthia J. Life-Threatening Reaction with Topical 5-Fluorouracil. **Drug Safety - Case Reports**, *[S. l.]*, v. 5, n. 1, p. 4, 2018. DOI: 10.1007/s40800-017-0068-6.

KOZIELSKI, Kristen L. et al. Cancer-selective nanoparticles for combinatorial siRNA delivery to primary human GBM in vitro and in vivo. **Biomaterials**, *[S. l.]*, v. 209, n. April, p. 79–87, 2019. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.04.020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.020.

KRATTINGER, Regina; BARYSCH, Marjam J.; RAMELYTE, Egle; MICALETTO, Sara; GOLDINGER, Simone M.; DIMITRIOU, Florentia; DUMMER, Reinhard. The World of Melanoma: Epidemiologic, Genetic, and Anatomic Differences of Melanoma Across the Globe. **Current Oncology Reports**, *[S. l.]*, v. 20, n. 11, 2018. DOI: 10.1007/s11912-018-0732-8.

KRISHNA, Swati; KUMAR, S. Birendra; MURTHY, T. P. Krishn.; MURAHARI, Manikanta. Structure-based design approach of potential BCL-2 inhibitors for cancer chemotherapy. **Computers in Biology and Medicine**, *[S. l.]*, v. 134, n. April, p. 104455, 2021. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2021.104455. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104455.

KÜCHLER, Sarah; ABDEL-MOTTALEB, Mona; LAMPRECHT, Alf; RADOWSKI, Michal R.; HAAG, Rainer; SCHÄFER-KORTING, Monika. Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. 1.]*, v. 377, n. 1–2, p. 169–172, 2009. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.04.046. LABALA, Suman; JOSE, Anup; CHAWLA, Sumeet Rajesh; KHAN, Mohammed Shareef; BHATNAGAR, Shubhmita; KULKARNI, Onkar Prakash; VAMSI, Venkata; VENUGANTI, Krishna. Effective melanoma cancer suppression by iontophoretic co-delivery of STAT3 siRNA and imatinib using gold nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. I.]*, v. 525, n. 2, p. 407–417, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.087. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.087.

LAI-CHEONG, Joey E.; MCGRATH, John A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine (United Kingdom)**, *[S. l.]*, v. 49, n. 6, p. 337–342, 2021. DOI: 10.1016/j.mpmed.2021.03.001. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.03.001.

LAKKADWALA, Sushant; SINGH, Jagdish. Dual Functionalized 5-Fluorouracil Liposomes as Highly Efficient Nanomedicine for Glioblastoma Treatment as Assessed in an In Vitro Brain Tumor Model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, *[S. l.]*, v. 107, n. 11, p. 2902–2913, 2018. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.07.020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.07.020.

LEE, Erinna F. et al. BCL-XL and MCL-1 are the key BCL-2 family proteins in melanoma cell survival. **Cell Death and Disease**, *[S. l.]*, v. 10, n. 5, 2019. DOI: 10.1038/s41419-019-1568-3. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1568-3.

LEE, Robert. Statistical Design of Experiments for Screening and OptimizationChemie-Ingenieur-Technik, 2019. DOI: 10.1002/cite.201800100.

LEITE, Marcel Nani; VIEGAS, Juliana Santos Rosa; PRAÇA, Fabíola Silva Garcia; DE PAULA, Natália Aparecida; RAMALHO, Leandra Náira Zambelli; BENTLEY, Maria Vitória Lopes Badra; FRADE, Marco Andrey Cipriani. Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the antimelanoma drug Dacarbazine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, *[S. I.]*, v. 160, n. October 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105769.

LEMOS, Camila N.; PEREIRA, Francieli; DALMOLIN, Luciana F.; CUBAYACHI, Camila; RAMOS, Danielle N.; LOPEZ, Renata F. V. **Chapter 6. Nanoparticles influence in skin penetration of drugs: In vitro and in vivo characterization**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-813665-2.00006-5. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813665-2.00006-5.

LENS, Marko B.; DAWES, Martin; GOODACRE, Tim; NEWTON-BISHOP, Julia A. Elective Lymph Node Dissection in Patients With Melanoma. **Archives of Surgery**, *[S. I.]*, v. 137, n. 4, p. 461, 2003. DOI: 10.1001/archsurg.137.4.461.

LI, Haipeng; AFACAN, Artin; LIU, Qingxia; XU, Zhenghe. Study interactions between fine particles and micron size bubbles generated by hydrodynamic cavitation. **Minerals Engineering**, *[S. l.]*, v. 84, p. 106–115, 2015. DOI: 10.1016/j.mineng.2015.09.023. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2015.09.023.

LI, Jun; XIE, Jun; ZHU, Jintao; TAO, Jun. Multifunctional Nanoparticle Approach for Targeting Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, *[S. l.]*, v. 19, n. 2, p. S89–S90, 2018. DOI: 10.1016/j.jisp.2018.09.011. Disponível em:

https://doi.org/10.1016/j.jisp.2018.09.011.

LIN, Hui Ping; SINGLA, Bhupesh; GHOSHAL, Pushpankur; FAULKNER, Jessica L.; CHERIAN-SHAW, Mary; O'CONNOR, Paul M.; SHE, Jin Xiong; BELIN DE CHANTEMELE, Eric J.; CSÁNYI, Gábor. Identification of novel macropinocytosis inhibitors using a rational screen of Food and Drug Administration-approved drugs. **British Journal of Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 175, n. 18, p. 3640–3655, 2018. DOI: 10.1111/bph.14429.

LIU, Fen; AI, Feiyan; TIAN, Li; LIU, Shaojun; ZHAO, Lian; WANG, Xiaoyan. Infliximab enhances the therapeutic effects of 5-fluorouracil resulting in tumor regression in colon cancer. **OncoTargets and Therapy**, *[S. l.]*, v. 9, p. 5999–6008, 2016. DOI: 10.2147/OTT.S109342.

LIU, Qi; DAS, Manisit; LIU, Yun; HUANG, Leaf. Targeted drug delivery to melanoma. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[S. I.]*, v. 127, p. 208–221, 2018. DOI: 10.1016/j.addr.2017.09.016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.016.

LOLLO, Giovanna et al. Drug delivery to tumours using a novel 5-FU derivative encapsulated into lipid nanocapsules. **Journal of Drug Targeting**, *[S. l.]*, v. 27, n. 5–6, p. 634–645, 2019. DOI: 10.1080/1061186X.2018.1547733. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/1061186X.2018.1547733.

LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, *[S. l.]*, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003. DOI: 10.1038/nrc1074. Disponível em: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc1074.

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

LU, Patrick Y. ..; LING LI, Port St .. Lucie; SIMONENKO, Gaithersburg. **Multi -** targeted rnai therapeutics for scarless wound healing of skin 2018.

LUIZ, Marcela Tavares; VIEGAS, Juliana Santos Rosa; ABRIATA, Juliana Palma; TOFANI, Larissa Bueno; VAIDERGORN, Miguel de Menezes; EMERY, Flavio da Silva; CHORILLI, Marlus; MARCHETTI, Juliana Maldonado. Docetaxelloaded folate-modified TPGS-transfersomes for glioblastoma multiforme treatment. **Materials Science and Engineering C**, *[S. I.]*, v. 124, n. March, p. 112033, 2021. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112033. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112033.

MAKONI, Pedzisai A.; KASONGO, Kasongo Wa; WALKER, Roderick B. Short term stability testing of efavirenz-loaded solid lipid nanoparticle (SLN) and nanostructured lipid carrier (NLC) dispersions. **Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 11, n. 8, 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11080397.

MANAGULI, Renuka S.; WANG, Julie T.; FARUQU, Farid N.; KUSHWAH, Varun; RAUT, Sushil Y.; SHREYA, Ajjappla B.; AL-JAMAL, Khuloud T.; JAIN, Sanyog; MUTALIK, Srinivas. Asenapine maleate-loaded nanostructured lipid carriers: Optimization and in vitro, ex vivo and in vivo evaluations. **Nanomedicine**, *[S. I.]*, v. 14, n. 7, p. 889–910, 2019. DOI: 10.2217/nnm-2018-0289.

MANSOURI, Sania; LAVIGNE, Patrick; CORSI, Karin; BENDERDOUR, Mohamed; BEAUMONT, Eric; FERNANDES, Julio C. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve Journal of transfection efficacy. European **Pharmaceutics** and Biopharmaceutics, [S. I.], v. 57, p. 1-8, 2004. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00155-3.

MANZANO, José Luís; LAYOS, Laura; BUGÉS, Cristina; DE LOS LLANOS GIL, María; VILA, Laia; MARTÍNEZ-BALIBREA, Eva; MARTÍNEZ-CARDÚS, Anna. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. **Annals of Translational Medicine**, *[S. I.]*, v. 4, n. 12, p. 237–237, 2016. DOI: 10.21037/atm.2016.06.07.

MARKHAM, Patricia et al. Psychosocial consequences of skin cancer screening. **Preventive Medicine Reports**, *[S. l.]*, v. 10, n. November 2017, p. 310–316, 2018. DOI: 10.1016/j.pmedr.2018.04.011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2018.04.011.

MARTIN, Jason; DUNCAN, F. Jason; KEISER, Tracy; SHIN, Samuel; KUSEWITT, Donna F.; OBERYSZYN, Tatiana; SATOSKAR, Abhay R.; VANBUSKIRK, Anne M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a critical role in pathogenesis of ultraviolet-B (UVB) -induced nonmelanoma skin cancer (NMSC). **The FASEB Journal**, *[S. l.]*, v. 23, n. 3, p. 720–730, 2009. DOI: 10.1096/fj.08-119628.

MASSARO, R. R.; FAIÃO-FLORES, F.; REBECCA, V. W.; SANDRI, S.; ALVES-FERNANDES, D. K.; PENNACCHI, P. C.; SMALLEY, K. S. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Inhibition of proliferation and invasion in 2D and 3D models by 2methoxyestradiol in human melanoma cells. **Pharmacological Research**, *[S. I.]*, v. 119, p. 242–250, 2017. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.02.013.

Mathematical Models of drug release. *In*: **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. [s.l: s.n.]. p. 66–86. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9.

METZIG, M. Oliver; FUCHS, D.; TAGSCHERER, K. E.; GRÖNE, H. J.; SCHIRMACHER, P.; ROTH, W. Inhibition of caspases primes colon cancer cells for 5-fluorouracil-induced TNF- α -dependent necroptosis driven by RIP1 kinase and NF- κ B. **Oncogene**, *[S. 1.]*, v. 35, n. 26, p. 3399–3409, 2016. DOI: 10.1038/onc.2015.398.

MISHRA, Vijay; BANSAL, Kuldeep K.; VERMA, Asit; YADAV, Nishika; THAKUR, Sourav. Solid Lipid Nanoparticles: Emerging Colloidal Nano Drug Delivery Systems. *[S. l.]*, n. Figure 1, p. 1–21, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10040191.

MÓ, Inês; SABINO, Ivo J.; MELO-DIOGO, Duarte De; LIMA-SOUSA, Rita; ALVES, Cátia G.; CORREIA, Ilídio J. The importance of spheroids in analyzing nanomedicine efficacy. **Nanomedicine**, *[S. I.]*, v. 15, n. 15, p. 1513–1525, 2020. DOI: 10.2217/nnm-2020-0054.

MOFIDI, Amirabbas; TOMPA, Emile; SPENCER, James; KALCEVICH, Christina; PETERS, Cheryl E.; KIM, Joanne; SONG, Chaojie; MORTAZAVI, Seyed Bagher;

DEMERS, Paul A. The economic burden of occupational non-melanoma skin cancer due to solar radiation. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, *[S. l.]*, v. 15, n. 6, p. 481–491, 2018. DOI: 10.1080/15459624.2018.1447118.

MOHAMMADINEJAD, Reza; DEHSHAHRI, Ali; MADAMSETTY, Vijay Sagar; ZAHMATKESHAN, Masoumeh; TAVAKOL, Shima; MAKVANDI, Pooyan; KHORSANDI, Danial. In vivo gene delivery mediated by non-viral vectors for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, *[S. l.]*, v. 325, n. June, p. 249–275, 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.038. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.038.

MONTAGNA, Erik; LOPES, Otávio Sérgio. Molecular basis of basal cell carcinoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, *[S. l.]*, v. 92, n. 4, p. 517–520, 2017. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20176544.

NARAYANA, Ashwatha; MATHEW, Maya; TAM, Moses; KANNAN, Rajni; MADDEN, Kathleen M.; GOLFINOS, John G.; PARKER, Erik C.; OTT, Patrick A.; PAVLICK, Anna C. Vemurafenib and radiation therapy in melanoma brain metastases. **Journal of Neuro-Oncology**, *[S. l.]*, v. 113, n. 3, p. 411–416, 2013. DOI: 10.1007/s11060-013-1127-1.

NASERI, Neda; VALIZADEH, Hadi; ZAKERI-MILANI, Parvin. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, *[S. l.]*, v. 5, n. 3, p. 305–313, 2015. DOI: 10.15171/apb.2015.043. Disponível em: http://dx.doi.org/10.15171/apb.2015.043.

NIIDOME, T.; HUANG, L. Gene Therapy Progress and Prospects : Nonviral vectors. **Gene therapy**, *[S. l.]*, v. 9, p. 1647–1652, 2002. DOI: 10.1038/sj.gt.3301923.

NUNES, Ana S.; BARROS, Andreia S.; COSTA, Elisabete C.; MOREIRA, André F.; CORREIA, Ilídio J. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and Bioengineering**, *[S. I.]*, v. 116, n. 1, p. 206–226, 2019. DOI: 10.1002/bit.26845.

OECD Guideline for thetesting of Chemicals: Skin Absorption in vitro Method. GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. [s.l: s.n.].

OH, Chang Mo; CHO, Hyunsoon; WON, Young Joo; KONG, Hyun Joo; ROH, Yun Ho; JEONG, Ki Heon; JUNG, Kyu Won. Nationwide trends in the incidence of melanoma and non-melanoma skin cancers from 1999 to 2014 in south korea. **Cancer Research and Treatment**, *[S. I.]*, v. 50, n. 3, p. 729–737, 2018. DOI: 10.4143/crt.2017.166.

OLESEN, Uffe H.; BOJESEN, Sophie; GEHL, Julie; HAEDERSDAL, Merete. Anticancer drugs and the regulation of Hedgehog genes GLI1 and PTCH1, a comparative study in nonmelanoma skin cancer cell lines. *[S. l.]*, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1097/CAD.000000000000551.

ONO, Mayumi; KUWANO, Michihiko. Molecular Mechanisms of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Activation and Response to Gefitinib and Other EGFR-T argeting Drugs. *[S. I.]*, v. 12, n. 24, p. 7242–7252, 2006. DOI:

10.1158/1078-0432.CCR-06-0646.

OSSEIRAN, Sam; CRUZ, Jomer Dela; JEONG, Sinyoung; WANG, Hequn; FTHENAKIS, Christina; EVANS, Conor L. Characterizing stratum corneum structure, barrier function, and chemical content of human skin with coherent Raman scattering imaging. **Biomedical Optics Express**, *[S. I.]*, v. 9, n. 12, p. 6425, 2018. DOI: 10.1364/boe.9.006425.

OZCAN, Gulnihal; OZPOLAT, Bulent; COLEMAN, Robert L.; SOOD, Anil K.; LOPEZ-BERESTEIN, Gabriel. Preclinical and clinical development of siRNAbased therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *[S. I.]*, v. 87, p. 108– 119, 2015. DOI: 10.1016/j.addr.2015.01.007. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.007.

PAN, Jingtong; RUAN, Wenyi; QIN, Mengyao; LONG, Yueming; WAN, Tao; YU, Kaiyue; ZHAI, Yuanhao; WU, Chuanbin; XU, Yuehong. Intradermal delivery of STAT3 siRNA to treat melanoma via dissolving microneedles. **Scientific Reports**, *[S. I.]*, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-19463-2. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19463-2.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; PASCHOAL, J. A. R.; LOPEZ, R. F. V. Quantification of 5-FU in skin samples for the development of new delivery systems for topical cancer treatment. **Pharmazie**, *[S. I.]*, v. 73, n. 3, p. 133–138, 2018. DOI: 10.1691/ph.2018.7138.

PIERSMA, Bram; HAYWARD, M. K.; WEAVER, Valerie M. Fibrosis and cancer: A strained relationship. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, *[S. I.]*, v. 1873, n. 2, 2020. DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188356.

PIJUAN, Jordi; BARCELÓ, Carla; MORENO, David F.; MAIQUES, Oscar; SISÓ, Pol; MARTI, Rosa M.; MACIÀ, Anna; PANOSA, Anaïs. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, *[S. I.]*, v. 7, n. JUN, p. 1–16, 2019. DOI: 10.3389/fcell.2019.00107.

PIMENTEL-MORAL, S.; TEIXEIRA, M. C.; FERNANDES, A. R.; BORRÁS-LINARES, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; MARTÍNEZ-FÉREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; SOUTO, E. B. Polyphenols-enriched Hibiscus sabdariffa extract-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): Optimization by multiresponse surface methodology. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. I.], v. 49, n. September 2018, p. 660–667, 2019. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.12.023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.12.023.

PINTO, Bronson I.; CRUZ, Nathan D.; LUJAN, Oscar R.; PROPPER, Catherine R.; KELLAR, Robert S. In Vitro Scratch Assay to Demonstrate Effects of Arsenic on Skin Cell Migration. **Journal of visualized experiments : JoVE**, *[S. I.]*, n. 144, p. 1–11, 2019. a. DOI: 10.3791/58838.

PINTO, Fátima; DE BARROS, Dragana P. C.; REIS, Catarina; FONSECA, Luis
P. Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with retinoids by central composite design. Journal of Molecular Liquids, [S. I.], v. 293, p. 111468, 2019.
b. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111468. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111468.

POLITIS, Stavros N.; COLOMBO, Paolo; COLOMBO, Gaia; REKKAS, Dimitrios M. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, *[S. I.]*, v. 43, n. 6, p. 889–901, 2017. DOI: 10.1080/03639045.2017.1291672.

PONDICHERRY, Ashwini; MARTIN, Richard; MEREDITH, Ineke; ROLFE, Jack; EMANUEL, Patrick; ELWOOD, Mark. The burden of non-melanoma skin cancers in Auckland, New Zealand. **Australasian Journal of Dermatology**, *[S. I.]*, v. 59, n. 3, p. 210–213, 2018. DOI: 10.1111/ajd.12751.

PRAÇA, Fabíola Silva Garcia; MEDINA, Wanessa Silva Garcia; ELOY, Josimar O.; PETRILLI, Raquel; CAMPOS, Patrícia Mazureki; ASCENSO, Andreia; BENTLEY, Maria Vitória L. B. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, *[S. I.]*, v. 111, n. August 2017, p. 121–132, 2018. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.034. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.034.

QIAO, Hongzhi; ZHANG, Lei; FANG, Dong; ZHU, Zhenzhu; HE, Weijiang; HU, Lihong; DI, Liuqing; GUO, Zijian; WANG, Xiaoyong. Surmounting tumor resistance to metallodrugs by co-loading a metal complex and siRNA in nanoparticles. **Chemical Science**, *[S. I.]*, v. 12, n. 12, p. 4547–4556, 2021. DOI: 10.1039/d0sc06680j.

RADAIC, Allan; DE PAULA, Eneida; DE JESUS, Marcelo Bispo. Factorial design and development of solid lipid nanoparticles (SLN) for gene delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, *[S. l.]*, v. 15, n. 2, p. 1793–1800, 2015. DOI: 10.1166/jnn.2015.9002.

RAHIM, Nauman; WUI, Tin. 5-Fluorouracil ethosomes – skin deposition and melanoma permeation synergism with microwave. *[S. l.]*, v. 46, p. 568–578, 2018.

RAJPUT, Amarjitsing P.; BUTANI, Shital B. Resveratrol anchored nanostructured lipid carrier loaded in situ gel via nasal route: Formulation, optimization and in vivo characterization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, *[S. I.]*, v. 51, p. 214–223, 2019. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.01.040. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.040.

REN, Zhongyang; CHEN, Zhongzheng; ZHANG, Yuanyuan; LIN, Xiaorong; LI, Bin. Characteristics and rheological behavior of Pickering emulsions stabilized by tea water-insoluble protein nanoparticles via high-pressure homogenization. **International Journal of Biological Macromolecules**, *[S. I.]*, v. 151, p. 247–256, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.090.

RENNICK, Joshua J.; JOHNSTON, Angus P. R.; PARTON, Robert G. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. **Nature Nanotechnology**, *[S. l.]*, v. 16, n. 3, p. 266–276, 2021. DOI: 10.1038/s41565-021-00858-8. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8.

RESNIER, Pauline et al. Efficient ferrocifen anticancer drug and Bcl-2 gene therapy using lipid nanocapsules on human melanoma xenograft in mouse. **Pharmacological Research**, [S. I.], v. 126, p. 54–65, 2017. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.01.031. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.01.031.

ROBERTS, M. S. et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, *[S. I.]*, v. 247, p. 86–105, 2017. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.12.022.

ROCHA, Emmily Dantas; FERREIRA, Marcia Regina Spuri; DOS SANTOS NETO, Edson; BARBOSA, Eduardo José; LÖBENBERG, Raimar; LOURENÇO, Felipe Rebello; BOU-CHACRA, Nadia. Enhanced In Vitro Antimicrobial Activity of Polymyxin B–Coated Nanostructured Lipid Carrier Containing Dexamethasone Acetate. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, *[S. l.]*, v. 16, n. 1, p. 125–135, 2021. DOI: 10.1007/s12247-020-09427-3.

ROHIT, Bhandari; PAL, Kaur Indu. A Method to Prepare Solid Lipid Nanoparticles with Improved Entrapment Efficiency of Hydrophilic Drugs. Current Nanoscience, [S. *I.*], ٧. 9, n. 2, 211-220, 2013. DOI: p. 10.2174/1573413711309020008. Disponível em: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-4137&volume=9&issue=2&spage=211.

ROSA, Juliana dos Santos. Carreador lipídico nanoestruturado multifuncional contendo 5-fluorouracil e siRNA para tratamento de câncer de pele. **Dissertações - Universidade de São Paulo**, *[S. l.]*, p. 1–160, 2019. DOI: https://doi.org/10.11606/D.60.2019.tde-24052019-145811.

ROSA, Juliana; SUZUKI, Isabella; KRAVICZ, Marcelo; CARON, Angelo; PUPO, Ana Vitoria; PRACA, Fabiola Garcia; BENTLEY, Maria Vitoria Lopes Badra. Current non-viral siRNA delivery systems as a promissing treatment of skin diseases. **Current Pharmaceutical Design**, *[S. l.]*, v. 24, 2018. DOI: 10.2174/1381612824666180807120017. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30084329. Acesso em: 29 ago. 2018.

RUAN, Renquan; CHEN, Ming; SUN, Sijie; WEI, Pengfei; ZOU, Lili; LIU, Jing; GAO, Dayong; WEN, Longping; DING, Weiping. Topical and Targeted Delivery of siRNAs to Melanoma Cells Using a Fusion Peptide Carrier. **Scientific Reports**, *[S. I.]*, v. 6, n. June, p. 1–11, 2016. DOI: 10.1038/srep29159. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/srep29159.

Ružica Jurakić Tončić 2018.pdf. , [s.d.].

SALA, M.; DIAB, R.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 535, n. 1–2, p. 1–17, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.046. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.046.

SANSON, Ananda Lima; CRISTINA, Suéllen; SILVA, Rennó; COUTINHO, Matheus; MARTINS, Gonçalves; GIUSTI-PAIVA, Alexandre; MAIA, Patrícia Penido; MARTINS, Isarita. Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, *[S. I.]*, v. 47, n. Group 1, 2011. DOI: 10.1590/S1984-82502011000200017. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/bjps/v47n2/v47n2a17.pdf. SANTINI, Roberta et al. HEDGEHOG-GLI signaling drives self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. **Stem Cells**, *[S. l.]*, v. 30, n. 9, p. 1808–1818, 2012. DOI: 10.1002/stem.1160.

SASI, Sharath P.; YAN, Xinhua; ENDERLING, Heiko; PARK, Daniel; CURRY, Cindy; COLEMAN, Christina; HLATKY, Lynn; KISHORE, Raj; GOUKASSIAN, David A. Breaking the "harmony" of TNF-α signaling for cancer treatment. **Oncogene**, *[S. l.]*, v. 31, n. 37, p. 4117–4127, 2014. DOI: 10.1038/onc.2011.567.BREAKING.

SATO, Yusuke; MATSUI, Hideki; SATO, Risa; HARASHIMA, Hideyoshi. Neutralization of negative charges of siRNA results in improved safety and efficient gene silencing activity of lipid nanoparticles loaded with high levels of siRNA. **Journal of Controlled Release**, *[S. l.]*, v. 28, n. 284, p. 179–187, 2018. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.06.017.

SAÚDE, Bula para o profissional Da. Onpattro® (patisirana). [S. I.], v. 1, 2020.

SAW, Phei Er; SONG, Er Wei. siRNA therapeutics: a clinical reality. **Science China Life Sciences**, *[S. l.]*, v. 63, n. 4, p. 485–500, 2020. DOI: 10.1007/s11427-018-9438-y.

SERASINGH, Madhavika N.; MISSERT, Derek J.; ASCIOLLA, James J.; WIEDER, Shira Y.; PODGRABINSKA, Simona; IZADMEHR, Sudeh; BELBIN, Gillian; SKOBE, Mihaela; CHIPUK, Jerry E. Anti-apoptotic BCL-2 proteins govern cellular outcome following B-RAFV600E inhibition and can be targeted to reduce resistance. **Oncogene.**, *[S. 1.]*, v. 34, n. 7, p. 857–867., 2015. DOI: 10.1038/nrg3575.Systems.

SHAIN, A. Hunter; BASTIAN, Boris C. From melanocytes to melanomas. **Nature Publishing Group**, *[S. l.]*, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016. DOI: 10.1038/nrc.2016.37. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.37.

SHASTRI, Divyesh H. Effective Delivery Routes and Strategies for Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC). **Current Pharmaceutical Design**, *[S. I.]*, v. 23, n. 43, p. 6592–6601, 2018. DOI: 10.2174/1381612823666171122111132. Disponível em: http://www.eurekaselect.com/157576/article.

SHEN, B. B.; GAO, X. C.; YU, S. Y.; MA, Y.; JI, C. H. Fabrication and potential application of a di-functional magnetic system: Magnetic hyperthermia therapy and drug delivery. **CrystEngComm**, *[S. l.]*, v. 18, n. 7, p. 1133–1138, 2016. DOI: 10.1039/c5ce02267c.

SHEVALKAR, Ganesh; PAI, Rohan; VAVIA, Pradeep. Nanostructured Lipid Carrier of Propofol: a Promising Alternative to Marketed Soybean Oil–Based Nanoemulsion. **AAPS PharmSciTech**, *[S. l.]*, v. 20, n. 5, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1208/s12249-019-1408-x.

SHIGEFUJI, Miki; TOKUDOME, Yoshihiro. Nanoparticulation of hyaluronic acid: A new skin penetration enhancing polyion complex formulation: Mechanism and future potential. **Materialia**, *[S. I.]*, v. 14, n. June, p. 100879, 2020. DOI: 10.1016/j.mtla.2020.100879. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.mtla.2020.100879. SHIMOJO, Andréa A. M.; FERNANDES, Ana Rita V.; FERREIRA, Nuno R. E.; SANCHEZ-LOPEZ, Elena; SANTANA, Maria H. A.; SOUTO, Eliana B. Evaluation of the influence of process parameters on the properties of resveratrol-loaded NLC using 22 full factorial design. **Antioxidants**, *[S. l.]*, v. 8, n. 8, 2019. DOI: 10.3390/antiox8080272.

SIEPMANN, Juergen; PEPPAS, Nicholas A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. I.]*, v. 418, n. 1, p. 6–12, 2011. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.051.

SINI, Maria Cristina et al. Genetic alterations in main candidate genes during melanoma progression. [S. I.], v. 9, n. 9, p. 8531–8541, 2018.

SMALLEY, Keiran S. M.; HAASS, Nikolas K.; BRAFFORD, Patricia A.; LIONI, Mercedes; FLAHERTY, Keith T.; HERLYN, Meenhard. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. **Molecular Cancer Therapeutics**, *[S. l.]*, v. 5, n. 5, p. 1136–1144, 2006. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0084.

SPALLONE, Giulia; BOTTI, Elisabetta; COSTANZO, Antonio. Targeted Therapy in Nonmelanoma Skin Cancers. *[S. l.]*, p. 2255–2273, 2011. DOI: 10.3390/cancers3022255.

SULLENGER, Bruce A.; GILBOA, Eli. Emerging clinical applications of RNA. **Nature**, *[S. I.]*, v. 418, n. 7, p. 252–258, 2002.

TALARI, Abdullah Chandra Sekhar; MARTINEZ, Marcela A. Garci.; MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham Ur. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, *[S. l.]*, v. 52, n. 5, p. 456–506, 2017. DOI: 10.1080/05704928.2016.1230863.

TAVARES LUIZ, Marcela; SANTOS ROSA VIEGAS, Juliana; PALMA ABRIATA, Juliana; VIEGAS, Felipe; TESTA MOURA DE CARVALHO VICENTINI, Fabiana; LOPES BADRA BENTLEY, Maria Vitória; CHORILLI, Marlus; MALDONADO MARCHETTI, Juliana; TAPIA-BLÁCIDO, Delia Rita. Design of experiments (DoE) to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 165, n. July 2020, p. 127–148, 2021. DOI: 10.1016/j.ejpb.2021.05.011.

TIWARI, Gaurav; TIWARI, Ruchi; BANNERJEE, SaurabhK; BHATI, L.; PANDEY, S.; PANDEY, P.; SRIWASTAWA, Birendra. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, *[S. l.]*, v. 2, n. 1, p. 2, 2012. DOI: 10.4103/2230-973x.96920.

TOFANI, Larissa B.; ABRIATA, Juliana P.; LUIZ, Marcela T.; MARCHETTI, Juliana M.; SWIECH, Kamilla. Establishment and characterization of an in vitro 3D ovarian cancer model for drug screening assays. **Biotechnology Progress**, *[S. l.]*, v. 36, n. 6, 2020. DOI: 10.1002/btpr.3034.

TOFANI, Larissa Bueno; DEPIERI, Lívia Vieira; CAMPOS, Patrícia Mazureki; RIUL, Thalita Bachelli; ANTONIETTO, Kamilla Swiech. In Vitro TyRP-1 Knockdown Based on siRNA Carried by Liquid Crystalline Nanodispersions : an Alternative Approach for Topical Treatment of Vitiligo. *[S. l.]*, 2018.

TORCHILIN, Vladimir P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. **Nature Publishing Group**, *[S. l.]*, v. 13, n. 11, p. 813–827, 2014. DOI: 10.1038/nrd4333. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nrd4333.

TRAVNICKOVA, Eva; MIKULA, Premysl; OPRSAL, Jakub; BOHACOVA, Marie; KUBAC, Lubomir; KIMMER, Dusan; SOUKUPOVA, Jana; BITTNER, Michal. Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes. **AMB Express**, *[S. l.]*, v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s13568-019-0909-z. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13568-019-0909-z.

TRISCIUOGLIO, Daniela; DEL BUFALO, Donatella. New insights into the roles of antiapoptotic members of the Bcl-2 family in melanoma progression and therapy. **Drug Discovery Today**, *[S. l.]*, v. 26, n. 5, p. 1126–1135, 2021. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.01.027. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.027.

TZANAKIS, I.; LEBON, G. S. B.; ESKIN, D. G.; PERICLEOUS, K. A. Characterizing the cavitation development and acoustic spectrum in various liquids. **Ultrasonics Sonochemistry**, *[S. I.]*, v. 34, p. 651–662, 2017. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.034. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.034.

VAN OVERBEEKE, Eline; MICHELSEN, Sissel; TOUMI, Mondher; STEVENS, Hilde; TRUSHEIM, Mark; HUYS, Isabelle; SIMOENS, Steven. Market access of gene therapies across Europe, USA, and Canada: challenges, trends, and solutions. **Drug Discovery Today**, *[S. l.]*, v. 26, n. 2, p. 399–415, 2021. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.11.024. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.024.

VERCAUTEREN, Dries; VANDENBROUCKE, Roosmarijn E.; JONES, Arwyn T.; REJMAN, Joanna; DEMEESTER, Joseph; DE SMEDT, Stefaan C.; SANDERS, Niek N.; BRAECKMANS, Kevin. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: Optimization and pitfalls. **Molecular Therapy**, *[S. l.]*, v. 18, n. 3, p. 561–569, 2010. DOI: 10.1038/mt.2009.281. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/mt.2009.281.

VICENTINI, Fabiana Testa Moura De Carvalho; BORGHETI-CARDOSO, Lívia Neves; DEPIERI, Lívia Vieira; DE MACEDO MANO, Danielle; ABELHA, Thais Fedatto; PETRILLI, Raquel; BENTLEY, Maria Vitória Lopes Badra. **Delivery** systems and local administration routes for therapeutic siRNAPharmaceutical Research, 2013. DOI: 10.1007/s11095-013-0971-1.

VIEGAS, Juliana Santos Rosa; PRAÇA, Fabiola Garcia; CARON, Angelo Luis; SUZUKI, Isabella; SILVESTRINI, Ana Vitoria Pupo; MEDINA, Wanessa Silva Garcia; DEL CIAMPO, Jose Orestes; KRAVICZ, Marcelo; BENTLEY, Maria Vitória Lopes Badra. Nanostructured lipid carrier co-delivering tacrolimus and TNF-α siRNA as an innovate approach to psoriasis. **Drug Delivery and Translational Research**, *[S. I.]*, v. 10, n. 3, p. 646–660, 2020. DOI: 10.1007/s13346-020-00723-6.

VOGLER, Meike. Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. [S. I.], v. 2014, 2014.

WAGHULE, Tejashree; RAPALLI, Vamshi Krishna; SINGHVI, Gautam; MANCHANDA, Prachi; HANS, Neha; DUBEY, Sunil Kumar; HASNAIN, Md Saquib; NAYAK, Amit Kumar. Voriconazole loaded nanostructured lipid carriers based topical delivery system: QbD based designing, characterization, in-vitro and ex-vivo evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, *[S. I.]*, v. 52, p. 303–315, 2019. DOI: 10.1016/j.jddst.2019.04.026. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.04.026.

WANG, Hao; LIU, Weisha; SUN, Meng; CHEN, Dubo; ZENG, Lingbing; LU, Liqun; XIE, Jing. Inhibitor analysis revealed that clathrin-mediated endocytosis is involed in cellular entry of type III grass carp reovirus. **Virology Journal**, *[S. l.]*, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1186/s12985-018-0993-8.

WANG, Jiang lin; YIN, Wen jun; ZHOU, Ling yun; ZHOU, Ge; LIU, Kun; HU, Can; ZUO, Xiao cong; WANG, Ya feng. Risk of non-melanoma skin cancer for rheumatoid arthritis patients receiving TNF antagonist: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Rheumatology**, *[S. l.]*, v. 39, n. 3, p. 769–778, 2020. a. DOI: 10.1007/s10067-019-04865-y.

WANG, Y. Onglu; YOU, W. E. I.; LI, X. Ueming; CAR, Anti-vegfr; CAR, Anti-hcd. Current status of gene therapy in melanoma treatment. **Biocell**, *[S. I.]*, v. 44, p. 167–174, 2020. b. DOI: 10.32604/biocell.2020.09023.

WINKLER, Juliane; ABISOYE-OGUNNIYAN, Abisola; METCALF, Kevin J.; WERB, Zena. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. **Nature Communications**, *[S. I.]*, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-18794-x. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x.

 WIRTH, Thomas; PARKER, Nigel; YLÄ-HERTTUALA, Seppo. History of gene

 therapy.
 Gene, [S. I.], v. 525, n. 2, p. 162–169, 2013. DOI:

 10.1016/j.gene.2013.03.137.
 Disponível

 http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137.

WU, Xin; ZHENG, Yawen; YANG, Dan; CHEN, Taijun; FENG, Bo; WENG, Jie; WANG, Jianxin. A strategy using mesoporous polymer nanospheres as nanocarriers of Bcl-2 siRNA towards breast cancer therapy. **J. Mater. Chem. B**, *[S. l.]*, v. 1, p. 2–4, 2019.

XIONG, Qingqing; LEE, Gha Young; DING, Jianxun; LI, Wenliang; SHI, Jinjun. Biomedical applications of mRNA nanomedicine. **Nano Research**, *[S. l.]*, v. 11, n. 10, p. 5281–5309, 2018.

YADAV, Arun Chander; GOPISANKAR, M. G. Gene therapy. Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology: Volume 1: General and Molecular Pharmacology: Principles of Drug Action, [S. I.], n. Figure 1, p. 319–328, 2019. DOI: 10.1007/978-981-32-9779-1_23.

YADAV, Khushwant S. High Pressure Homogenizer in Pharmaceuticals: Understanding Its Critical Processing Parameters and Applications. *[S. I.]*, 2019.

YI, Jianhua; ZHU, Zhenbao; MCCLEMENTS, D. Julian; DECKER, Eric A. In fluence of Aqueous Phase Emulsifiers on Lipid Oxidation in Water- in-Walnut Oil Emulsions. *[S. I.]*, 2014. DOI: 10.1021/jf404593f.

YOOZBASHI, Mohammad; RASHIDZADEH, Hamid; KERMANIAN, Mehraneh; SADIGHIAN, Somayeh; HOSSEINI, Mir Jamal; KABOLI, Zahra; ROSTAMIZADEH, Kobra. Magnetic nanostructured lipid carrier for dual triggered curcumin delivery: Preparation, characterization and toxicity evaluation on isolated rat liver mitochondria. **Journal of Biomaterials Applications**, *[S. I.]*, 2021. DOI: 10.1177/08853282211034625.

YU, Miao; HAN, Shangcong; KOU, Zhongai; DAI, Jialing; LIU, Jiao; WEI, Chen; LI, Yitong; JIANG, Lutao; SUN, Yong. Lipid nanoparticle-based co-delivery of epirubicin and BCL-2 siRNA for enhanced intracellular drug release and Artificial reversing multidrug resistance. Cells. Nanomedicine and Biotechnology, 323-332, [S. 46, 2, 2018. DOI: *I.*], ν. n. p. 10.1080/21691401.2017.1307215. Disponível em: https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1307215.

ZEINDLER, Jasmin et al. Infiltration by myeloperoxidase-positive neutrophils is an independent prognostic factor in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, *[S. l.]*, v. 177, n. 3, p. 581–589, 2019. DOI: 10.1007/s10549-019-05336-3. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10549-019-05336-3.

ZHANG, Lan; MAO, Shirui. Applications of quality by design (QbD) and its tools in drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, *[S. I.]*, v. 11, n. 1, p. 144–145, 2016. DOI: 10.1016/j.ajps.2015.11.084. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2015.11.084.

ZHANG, Liangliang; LIANG, Duanwei; CHEN, Changmai; WANG, Yuan; AMU, Gubu; YANG, Jiali; YU, Lijia; DMOCHOWSKI, Ivan J.; TANG, Xinjing. Circular siRNAs for Reducing Off-Target Effects and Enhancing Long-Term Gene Silencing in Cells and Mice. **Molecular Therapy: Nucleic Acid**, *[S. l.]*, v. 10, n. March, p. 237–244, 2018. a. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.12.007. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.007.

ZHANG, Tongwu; DUTTON-REGESTER, Ken; BROWN, Kevin M.; HAYWARD, Nicholas K. The genomic landscape of cutaneous melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, *[S. l.]*, v. 29, n. 3, p. 266–283, 2016. DOI: 10.1111/pcmr.12459.

ZHANG, Wei Wei et al. The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. **Human Gene Therapy**, *[S. l.]*, v. 29, n. 2, p. 160–179, 2018. b. DOI: 10.1089/hum.2017.218.

ZHENG, Luyao; ZHAO, Zhiyuan; YANG, Ye; LI, Yaming; WANG, Chengxiao. Novel skin permeation enhancers based on amino acid ester ionic liquid: Design and permeation mechanism. **International Journal of Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 576, n. January, p. 119031, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119031. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119031.



Anexo I: Termo de consentimento livre e esclarecido

Experimento com pele humana

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Título da pesquisa: "Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado contendo pool de siRNAs associados à agente antitumoral como uma abordagem terapêutica multifuncional para o câncer de pele".

Pesquisadores:

Responsável: Doutoranda Juliana Santos Rosa Viegas Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley (FCFRP) Colaborador: Doutorando Marcel Nani Leite (FMRP) Colaborador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade (FMRP)

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o (a) senhor (a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado (a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

O objetivo da pesquisa é avaliar o comportamento de nanopartículas na pele humana, ou seja, um fragmento de pele humana será mantido em um frasco contendo nutrientes para mantê-lo e nanopartículas serão aplicadas. Esse fragmento de pele será usado para entender como as nanopartículas se comportam na pele humana, com o objetivo final de serem aplicadas para tratar câncer de pele. Atualmente, são utilizados muitos animais para este tipo de teste, com isso a padronização em cultura de pele humana visa uma alternativa ao uso de animais podendo ter uma maior rapidez na descoberta de novos métodos eficazes contra o câncer.

Ao decidir participar e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o senhor (a) receberá uma via do TCLE assinado e rubricado em todas as páginas pelo senhor (a) e pelo pesquisador responsável e assim estará cedendo um fragmento de tecido de aproximadamente 15 cm². Os fragmentos de tecido serão colocados num vidro com soro fisiológico e levados para o laboratório sob responsabilidade do pesquisador. No laboratório, o fragmento será lavado e limpo, e pequenos pedaços da pele serão colocados em cultura dentro de uma estufa, e ao final do experimento os fragmentos serão descartados.

O senhor (a) está ciente que o risco dessa pesquisa é mínimo e se diz respeito a quebra de sigilo ou confidencialidade dos dados, porém o pesquisador tomará todas as medidas para que isso não aconteça. Como benefício indireto, o senhor (a) está contribuindo com a doação da sua pele (que seria descartada na cirurgia), que visa inovar os estudos contra câncer de pele, diminuindo assim o uso de animais de laboratório. Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o (a) senhor (a) tem liberdade deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o (a) senhor (a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o (a) senhor (a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país. Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr. (a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório "Avaliação da permeação e retenção de nanopartículas lipídicas" criado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de pele para fins de pesquisa e análise científica. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de pele para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante a cirurgia plástica. Após coletado será guardado neste biorrepositório no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP – Av. do Café s/n – Monte

Alegre – telefone: (16) 33154302 até momento de utilização. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de tecido será identificada por meio de códigos numéricos. Quanto ao material, será coletado aproximadamente 15 cm². Não haverá riscos em decorrência da coleta uma vez que após a cirurgia a amostra seria descartada.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato do (a) senhor (a), para que seja possível encontrá-lo (a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado caso não haja necessidade de uso para a pesquisa científica. Declaramos para os devidos fins que seu material biológico armazenado neste biorrepositório caso não utilizado em sua totalidade será devidamente descartado.

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Nome do pesquisador:_____

Assinatura:		data:	
Li, concordo com os te	rmos e aceito ser p	participante da pesquisa a	cima descrita.
Dados do participant	e:		
Nome:		,RG:	,
Endereço:			_, nº,
Bairro	_, cidade	, telefone	
Assinatura:		data:	

Anexo II: Parecer de liberação de experimentos com seres humanos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 027/2020 kms

Ribeirão Preto, 22 de setembro de 2020.

À pesquisadora Juliana S. Rosa Viegas FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora, Informamos que o protocolo de pesquisa intitulado "Desenvolvimento de **carreador lipídico nanoestruturado contendo pool de siRNAs associados à agente antitumoral como uma abordagem terapêutica multifuncional para o câncer de pele**" (CAAE: 24493619.2.0000.5403 – Protocolo CEP/FCFRP nº 519), foi aprovado "ad referendum" do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP em 30/03/2020 e referendado, por unanimidade, em sua 195º reunião ordinária, realizada em 23/04/2020, conforme Parecer Consubstanciado nº 3.942.905.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local". Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o <u>relatório final da</u>

<u>pesquisa em formulário próprio deste Comitê</u>, bem como comunicada qualquer <u>alteração, intercorrência ou interrupção</u> do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Ommachado.

Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado Coordenadora do CEP/FCFRP

Comitê de Ética em Pesquisa FCFRP/USP Avenida do Café s/n² - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP Fone: (16) 3315-4213 – Fax: (16) 3315-4892 - cep@fcfrp.usp.br

Anexo III: Certificado da Comissão de ética do uso de animais (CEUA)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos o adendo da proposta intitulada "Carreador lipídico nanoestruturado multifuncional contendo 5-fluorouracil e siRNA para tratamento de câncer de pele", registrada sob no 19.1.718.60.2, sob a responsabilidade de Juliana dos Santos Rosa Viegas e Maria Vitória Lopes Badra Bentley, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 0 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada ad referendum em 23/07/2020 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

() Ensino (x) Pesquisa Científica		
15/12/2019 a 15/08/2021		
Camundongo Knockout		
Swiss Nude (NU(lco)-Foxn1 nu)		
27		
20-25 g/ 6-8 semanas		
Ambos/ Indiferente		
Centro de Criação de Camundongos Especiais - FMRP		
Ribeirão Preto, 23 de julho de 2020. Ana Patrícia Yatsuda Natsui Coordenadora da CEUA-FCFRP Avenida do Café SIN2 - Monte Alegre — CEP 14040-903 - Ribeirão Preto — SP Comissão de Ética no Uso de Animais - <u>ceua@fcfrp.usp.br</u> Fone: (16) 3315-8559 - Fax: (16) 33152-4892		