

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ISABELLA LUIZ SUZUKI

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

Ribeirão Preto
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ISABELLA LUIZ SUZUKI

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

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

Área de Concentração: Medicamentos e
cosméticos

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

Ribeirão Preto
2020

SUZUKI, I. L.

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

DOUTORADO
FCFRPUSP
2020

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.

Suzuki, Isabella Luiz

Nanopartículas híbridas polímero-lipídicas associadas à internalização fotoquímica para liberação de siRNA na terapia tópica da psoríase. Ribeirão Preto, 2020.
108 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e cosméticos

Orientador: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra

1. siRNA. 2. Tratamento para psoríase. 3. Internalização fotoquímica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabella Luiz Suzuki

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

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

Área de Concentração: Medicamentos e cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela benção da vida, por cuidar dos meus passos em toda minha trajetória do doutorado, por me manter forte nos meus objetivos, com saúde e fé, e principalmente, por me proporcionar tudo que pude vivenciar nesses quatro anos de trabalho!

Aos meus pais, Cecilia e Daniel, por todo apoio e incentivo durante todo meu tempo na pós-graduação, por todo amor e dedicação na minha educação tanto como profissional como pessoal, pelo exemplo de pessoas, por me acompanharem de perto e de longe nessa caminhada, por vibrarem comigo em cada conquista, e por me ensinarem a buscar e lutar pelos meus objetivos. Essa conquista também é de vocês.

Ao meu irmão, Júlio, por todos os momentos alegres e cheios de risadas que você me proporciona diariamente, pelos momentos em família, conversas e todo carinho.

Ao meu noivo e grande amigo, Davi, meu companheiro de vida, que acompanhou de perto toda a minha trajetória durante o doutorado, que vibrou comigo nas minhas conquistas, que me acalmou quando precisei, que foi colo nos momentos difíceis, por todo o incentivo e apoio, por compreender cada fase que passei durante esses quatro anos, e por todo amor e carinho comigo e com minha família.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, por me acolher em seu grupo de pesquisa como aluna e me proporcionar o desenvolvimento dessa pesquisa, por todas as oportunidades, por todos ensinamentos e orientações, e pelo exemplo profissional. Obrigada pela dedicação e confiança dispensadas na minha formação.

Ao Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato, pela colaboração nessa pesquisa, por todo ensinamento científico e empréstimo do equipamento para irradiação dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, que foi essencial para conclusão e desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Samir Mitragotri, por me acolher em seu grupo de pesquisa durante meu estágio sanduíche na Universidade de Harvard, pelo imenso aprendizado e contribuição científica durante toda a minha estadia em seu laboratório. Foi uma imensa honra trabalhar esses meses com você.

Aos professores que foram banca da minha qualificação: Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari, Dra. Juliana Maldonado Marchetti e Dr. Antonio Claudio Tedesco, pelas orientações, dicas, ensinamentos e colaboração para o melhoramento do meu trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Fabíola, Henrique, José Orestes e Angela, pela dedicação ao laboratório e pela solicitude com que me ajudaram durante o desenvolvimento este trabalho.

Ao funcionário do Laboratório de Microscopia Avançada da FCFRP-USP, Eduardo Tozatto, pelo auxílio na obtenção das imagens por microscopia confocal.

A todos meus amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em especial à minha amiga Juliana Rosa, companheira de experimentos, pelos ensinamentos, conversas, convivência, apoio e amizade dentro e fora do laboratório.

Aos meus colegas de laboratório da Universidade de Harvard: Anvay, Vimisha, Katharina, Yongsheng, Zongmin, Anshuman e Jay pelo carinho com que me acolheram no laboratório, pela amizade e pela colaboração durante os meses que passei nos Estados Unidos.

Aos amigos que Ribeirão Preto me proporcionou, Margarete, Robson, Marcela, Juliana, Larissa e Giovanni, por todos os momentos juntos sempre cheios de risadas e boa conversa, por toda aprendizagem, pela convivência maravilhosa, pela amizade e companheirismo de cada um.

Aos amigos de São Carlos, que me acompanham desde sempre, de perto e de longe, por toda torcida, pela amizade, pelos momentos juntos sempre muito bons.

À minha querida família, pelo carinho, apoio e por sempre me acompanharem durante esses quatro anos de pesquisa. Em especial aos meus avós, Célia e Fernando, por todo amor e suporte.

As minhas amigas Ana Cristina e Maira, por serem minha família durante meu tempo nos Estados Unidos, por me receberem de braços abertos, me acolherem com todo carinho, pela amizade, por todos os momentos juntos e conversas. Eu sou muito grata pela vida de vocês e por tudo que vocês fizeram por mim durante esses meses longe do Brasil.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, por toda eficiência, disponibilidade e dedicação nos serviços prestados, em especial a Eleni, por sempre me ajudar com tudo que precisei em relação ao Programa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado e ao Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE) pela bolsa durante meu estágio no exterior.

À todos que não foram citados nominalmente, mas que de alguma forma colaboraram e participaram da execução deste trabalho, tornando possível sua realização, meus sinceros agradecimentos.

Este estudo faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanotecnologia Farmacêutica: uma abordagem transdisciplinar INCT-NANOFARMA, apoiado pela Fundação de Pesquisa de São Paulo (FAPESP, Brasil) Projeto nº 2014/50928-2 e pelo Conselho Nacional De Desenvolvimento Científico e Tecnológico " (CNPq, Brasil) Projeto n. 465687/2014-8

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".

Marthin Luther King

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

SUZUKI, I. L. **Polymer-lipid hybrid nanoparticles combined with photochemical internalization for siRNA release in the topical therapy of psoriasis.** 2020. 108f. Thesis (PhD). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Psoriasis is a chronic inflammatory disease that presents increased expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), a pro-inflammatory cytokine. With the discovery of RNAi, mediated by siRNA, it was possible to eliminate the expression of some genes of interest. However, for its application, it is necessary to use carriers that can protect and release siRNA in the target cells. In this context, the present study aimed to develop a hybrid polymer-lipid nanoparticles (PLNs) as a release system for siRNA, using photochemical internalization (PCI) as a tool to optimize the endosomal escape, through the encapsulation of the photosensitizer TPPS2a, aiming a formulation for topical therapy of psoriasis. For the development of the formulation of PLNs, Quality by Design was applied. The PLNs were composed of the lipid Compritol® 888 ATO (2.0%), Poloxamer 188 (1.5%) and the cationic hydrochlorinated polyalylamine polymer (PAH) (0.10%). TPPS2a was encapsulated in the formulation, giving rise to the formulation PLN-TPPS2a, with an encapsulation efficiency of 99%. The nanoparticles had an average size of 142 nm, for NPL formulation, and 253 nm, for PLN-TPPS2a, positive zeta potential, for both. The cell viability evaluation *in vitro* of PLN and PLN-TPPS2a was studied in keratinocytes and fibroblasts, showing that the treatment, in adequate concentrations, did not decrease cell viability and had high cell uptake verified by flow cytometry (above 80%) and by confocal microscopy. In the *in vitro* permeation and retention studies with Alexa647 siRNA in pig skins, it was quantified and showing the presence of siRNA and TPPS2a in the skin layers in the treatments with the NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 formulation. The *in vivo* assay in mice was done according to the psoriasis model using IMQ cream. The effectiveness of silencing the cytokine TNF α *in vivo* was evaluated by ELISA and skin histology, the results demonstrated that the TNF α siRNA when delivered by the formulation PLN-TPPS2a with irradiation (PCI) obtained the best result, with low levels of TNF α , reduction of flushing and peeling of the mice's skin. In view of the results, it can be concluded that the formulations developed (PLN and PLN-TPPS2a) associated with PCI of TPPS2a proved to be effective systems for administration and release of siRNA for topical therapy of psoriasis.

Keywords: siRNA. Topical therapy. Hybrid polymer-lipid nanoparticles. Gene therapy. Photochemical internalization. Psoriasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de interferência por RNA (RNAi)	3
Figura 2 - Estrutura molecular do polímero catiônico PAH.....	8
Figura 3 - Ilustração esquemática da estrutura e preparação dos dois principais tipos de NPLs. (I) matriz monolítica e (II) núcleo-casca.....	11
Figura 4 - Mecanismo da internalização fotoquímica no escape endossomal.....	13
Figura 5 - Principais fotossensibilizadores utilizados na internalização fotoquímica .	14
Figura 6 - Esquema evolutivo do quadro inflamatório característico da psoríase	18
Figura 7 - Esquema do método para obtenção das NPLs.....	30
Figura 8 - Esquema do protocolo feito no ensaio <i>in vivo</i> sem irradiação (escuro)	41
Figura 9 - Esquema do protocolo feito no ensaio <i>in vivo</i> com irradiação.....	42
Figura 10 - Esquema simplificado do protocolo experimental de indução de psoríase com creme IMQ associado aos tratamentos e posteriores análises	43
Figura 11 – Gráfico da seletividade do composto TPPS2a frente os interferentes ...	46
Figura 12 - Imagem fornecida pelo <i>software</i> Minitab com os parâmetros de qualidade escolhidos (Pdl, tamanho e potencial zeta) de acordo com a variância dos componentes que foram variáveis na formulação	52
Figura 13 - Esquema representativo da obtenção das NPLs complexadas ao siRNA, que pode ser eletrostaticamente complexo com lipídios ou polímeros catiônicos.....	53
Figura 14 – Ilustração do esquema de organização das nanopartículas da formulação NPL-TPPS2a-siRNA.....	54
Figura 15 - Determinação da complexação e estabilidade do complexo NPL-siRNA por eletroforese em gel de agarose 2%, 100 V, 20 minutos.....	55
Figura 16 - Picos resultantes obtidos por DSC dos referentes componentes: Compritol, Poloxamer, PAH, das NPLs, do TPPS2a e das NPL-TPPS2a no intervalo de aquecimento de 20 a 230°C.....	58
Figura 17 - Viabilidade celular das células HaCat e BALB/3T3 tratadas com a formulação NPL em um tempo de incubação de 4 horas.....	60
Figura 18 - Viabilidade celular da linhagem HaCaT com tratamento de: DMEM, NPL, NPL-TPPS2a, solução de TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA, na ausência de irradiação, durante 4 horas	62

Figura 19 - Viabilidade celular da linhagem HaCaT com tratamento de: DMEM, NPL, NPL-TPPS2a, solução de TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA, na ausência de irradiação, durante 18 horas	62
Figura 20 - Viabilidade celular da linhagem BALB/3T3 com tratamento de: DMEM, NPL, NPL-TPPS2a, solução de TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA, na ausência de irradiação, durante 4 horas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TPPS2 controle	63
Figura 21 - Viabilidade celular da linhagem BALB/3T3 com tratamento de: DMEM, NPL, NPL-TPPS2a, solução de TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA, na ausência de irradiação, durante 18 horas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TPPS2 controle	63
Figura 22 - Viabilidade celular da linhagem HaCaT com tratamento: DMEM, DMEM + 0,81 J/cm ² , NPL-TPPS2a + 0,81 J/cm ² , NPL-TPPS2a-siRNA + 0,81 J/cm ² , solução de TPPS2a + 0,81 J/cm ² , durante 4 horas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle	65
Figura 23 - Viabilidade celular da linhagem BALB/3T3 com tratamento: DMEM, DMEM + 0,81 J/cm ² , NPL-TPPS2a + 0,81 J/cm ² , NPL-TPPS2a-siRNA + 0,81 J/cm ² , solução de TPPS2a + 0,81 J/cm ² , durante 4 horas.* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle ...	66
Figura 24 – A) Captação celular nas linhagens HaCaT e BALB/3T3. B) Dot plot representativo dos tratamentos em células BALB/3T3 determinado por citometria de fluxo. C) Dot plot representativo dos tratamentos em células HaCaT determinado por citometria de fluxo.	68
Figura 25 - Imagens de microscopia confocal das células BALB/3T3 sem tratamento, tratadas com Lipofectamina (controle positivo), com siRNA Alexa647 em água livre de RNase, com NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 (concentração de 0,15 μ M), durante 4 horas	70
Figura 26 - Imagens de microscopia confocal com sobreposição dos canais das células BALB/3T3 sem tratamento, tratadas com lipofectamina (controle positivo), com siRNA Alexa647 em água livre de RNase, com NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 (concentração de 0,15 μ M de TPPS2a), tratamento de 4 horas	71
Figura 27 - Imagens de microscopia confocal das células HaCaT sem tratamento, tratadas com Lipofectamina (controle positivo), com siRNA Alexa647 em água livre de RNase, com NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 (concentração de 0,3 μ M de TPPS2a), tratamento de 4 horas	72
Figura 28 - Imagens de microscopia confocal com sobreposição dos canais das células HaCaT sem tratamento, tratadas com Lipofectamina (controle positivo), com	

siRNA Alexa647 em água livre de RNase, NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 (concentração de 0,3 μ M de TPPS2a), tratamento de 4 horas	73
Figura 29 - Ilustração da célula de difusão de Franz.....	74
Figura 30 - Permeação e retenção cutâneas <i>in vitro</i> da formulação de NPL-TPPS2a e solução de TPPS2a.....	75
Figura 31 - Imagens de microscopia confocal das peles suínas tratadas durante 24 horas em células de difusão de Franz, com os seguintes tratamentos: PBS (controle), NPL, siRNA Alexa647 livre, NPL-TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647	77
Figura 32 - Quantidade de TNF α mensurada nos tecidos por ELISA, em modelo de psoríase usando creme IMQ	81
Figura 33 - Imagens das inflamações cutâneas nos camundongos <i>Hairless</i> tratados diariamente com creme IMQ e seus tratamentos	84
Figura 34 - Imagens histológicas da pele dorsal dos camundongos <i>Hairless</i> tratados com creme IMQ e seus tratamentos	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente da fase móvel	28
Tabela 2 – Variáveis do planejamento Box-Behnken.....	29
Tabela 3 – Valores dos parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação	47
Tabela 4 – Valores da precisão e exatidão do método desenvolvido para quantificar o TPPS2a.....	48
Tabela 5 – Formulações resultantes do planejamento Box-Behnken com os valores das variáveis independentes em seus níveis	51
Tabela 6 – Diâmetro médio, Pdl, potencial zeta e eficiência de encapsulamento (EE) das formulações NPL e NPL-TPPS2a.....	56
Tabela 7 – Tamanho e concentração de partículas das formulações NPL e NPL-TPPS2a resultantes da análise por NTA.....	56
Tabela 8 – Pontos de fusão, entalpia e índice de recristalização dos componentes isolados das formulações, do fotossensibilizador, da mistura física, das NPLS e das NPL-TPPS2a.....	58
Tabela 9 – Diluições seriadas realizadas na cultura celular com o seu equivalente em concentração de TPPS2a.....	61
Tabela 10 – Valores em porcentagem da internalização celular do siRNA Alexa647 livre, do controle positivo Lipofectamina, e do tratamento com as NPLs durante 4 horas	68
Tabela 11 – Escala diária do PASI induzida por IMQ em camundongos <i>Hairless</i> tratados sem irradiação	79
Tabela 12 – Escala diária do PASI induzida por IMQ em camundongos <i>Hairless</i> tratados com irradiação	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
dsRNA	Dupla-fita de RNA
IMQ	Imiquimod
miRNA	Micro-RNA
PAH	Poli alilamina hidrociorada
PBS	Tampão fosfato-salino
PCI	<i>Photochemical internalization</i> – internalização fotoquímica
RNAi	<i>RNA interference</i> - Interferência por RNA
RNA _m	RNA mensageiro
RISC RNA	<i>Induced silencing complex</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tris-acetato-EDTA
TPPS _{2a}	Meso-tetrafenil porfirina dissulfonato (a=adjacente)
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
λ	Lambda
®	Marca Registrada
©	Copyright

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
Lista de símbolos	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Terapia gênica com interferência por RNA (<i>RNA interference</i> - RNAi)	1
1.2. Sistemas de liberação para veiculação de siRNA	6
1.3. Nanopartículas híbridas polímero-lipídicas (NPLs)	9
1.4. Internalização fotoquímica	12
1.5. Psoríase	16
1.6. Via de administração tópica para siRNAs	20
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivos específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Material	25
3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas	25
3.1.2. Equipamentos e acessórios.....	26
3.1.3. Células, tecidos e animais	27
3.2. Métodos	27
3.2.1. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificar o composto TPPS2a por CLAE	27
3.2.2. Planejamento experimental das formulações utilizando Box-Behnken (Quality by Design)	28
3.2.3. Obtenção das nanopartículas híbridas polímero-lipídicas (NPLs)	30
3.2.4. Encapsulamento do composto TPPS2a nas NPLs.....	30
3.2.5. Ensaios realizados em gel de eletroforese	31

3.2.5.1.	Incorporação e determinação da capacidade de complexação do siRNA nas NPLs.....	31
3.2.5.2.	Avaliação da descomplexação do siRNA das NPLs	31
3.2.6.	Caracterização das NPLs	32
3.2.6.1.	Análise do diâmetro médio hidrodinâmico e índice de polidispersão das partículas	32
3.2.6.2.	Medida da carga superficial das partículas	32
3.2.6.3.	Análise de rastreamento das NPLs (<i>Nanoparticle Tracking Analysis – NTA</i>)	33
3.2.6.4.	Análise da calorimetria diferencial de varredura (<i>Differential Scanning Calorimetry - DSC</i>)	33
3.2.6.5.	Eficiência de encapsulamento do TPPS2a nas NPLs	34
3.2.7.	Avaliação da viabilidade celular.....	34
3.2.7.1.	Linhagem e cultivo celular.....	34
3.2.7.2.	Tratamentos.....	35
3.2.7.3.	Viabilidade celular por redução da resazurina	36
3.2.8.	Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pelas NPLs em cultura celular	36
3.2.8.1.	Linhagem e cultivo celular.....	36
3.2.8.2.	Tratamento.....	36
3.2.8.3.	Avaliação da captação celular do siRNA por citometria de fluxo	37
3.2.8.4.	Avaliação da captação celular do siRNA por microscopia confocal de varredura a <i>laser</i>	37
3.2.9.	Avaliação in vitro da retenção cutânea do siRNA e permeação do TPPS2a veiculado pelas NPLs em modelo de pele de suínos.....	38
3.2.9.1.	Avaliação quantitativa da permeação do TPPS2a veiculado pelas NPLs por CLAE	38
3.2.9.2.	Avaliação da retenção cutânea do siRNA por microscopia confocal	39

3.2.10. Avaliação da eficácia do silenciamento do TNF α em modelo <i>in vivo</i> de psoríase após o tratamento com siRNA-TNF α veiculado pelas NPLs.....	40
3.2.10.1. Animais	40
3.2.10.2. Indução da psoríase e esquema terapêutico	40
3.2.10.3. Avaliação da eficácia do siRNA TNF α veiculado pelas NPLs por meio da quantificação de TNF- α por ELISA.....	43
3.2.10.4. Análises histológicas por coloração hematoxilina-eosina (H&E).....	44
3.2.11. Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificar o composto TPPS2a	45
4.2. Planejamento experimental e obtenção das nanopartículas híbridas polímero-lipídicas	49
4.3. Eficiência de complexação e integridade do siRNA nas NPLs.....	55
4.4. Caracterização das NPLs e NPL-TPPS2a	55
4.5. Avaliação da viabilidade celular	59
4.6. Avaliação da captação celular do siRNA em células HaCaT e BALB/3T3 por citometria de fluxo e microscopia confocal.....	67
4.7. Avaliação da retenção cutânea do siRNA-Alexa e permeação do TPPS2a veiculado pelas NPLs em modelo <i>in vitro</i> de pele suína.....	74
4.8. Avaliação da eficácia do silenciamento do TNF α em modelo <i>in vivo</i> de psoríase após o tratamento com siRNA TNF α veiculado pelas NPLs associadas a internalização fotoquímica	78
4.8.1. Avaliação da eficácia do siRNA TNF α veiculado pelas NPLs por quantificação dos níveis de TNF α por ELISA	80
4.8.2. Análise macroscópica das lesões e análises histológicas dos tecidos provenientes do modelo <i>in vivo</i> de psoríase.....	83
5. CONCLUSÕES.....	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

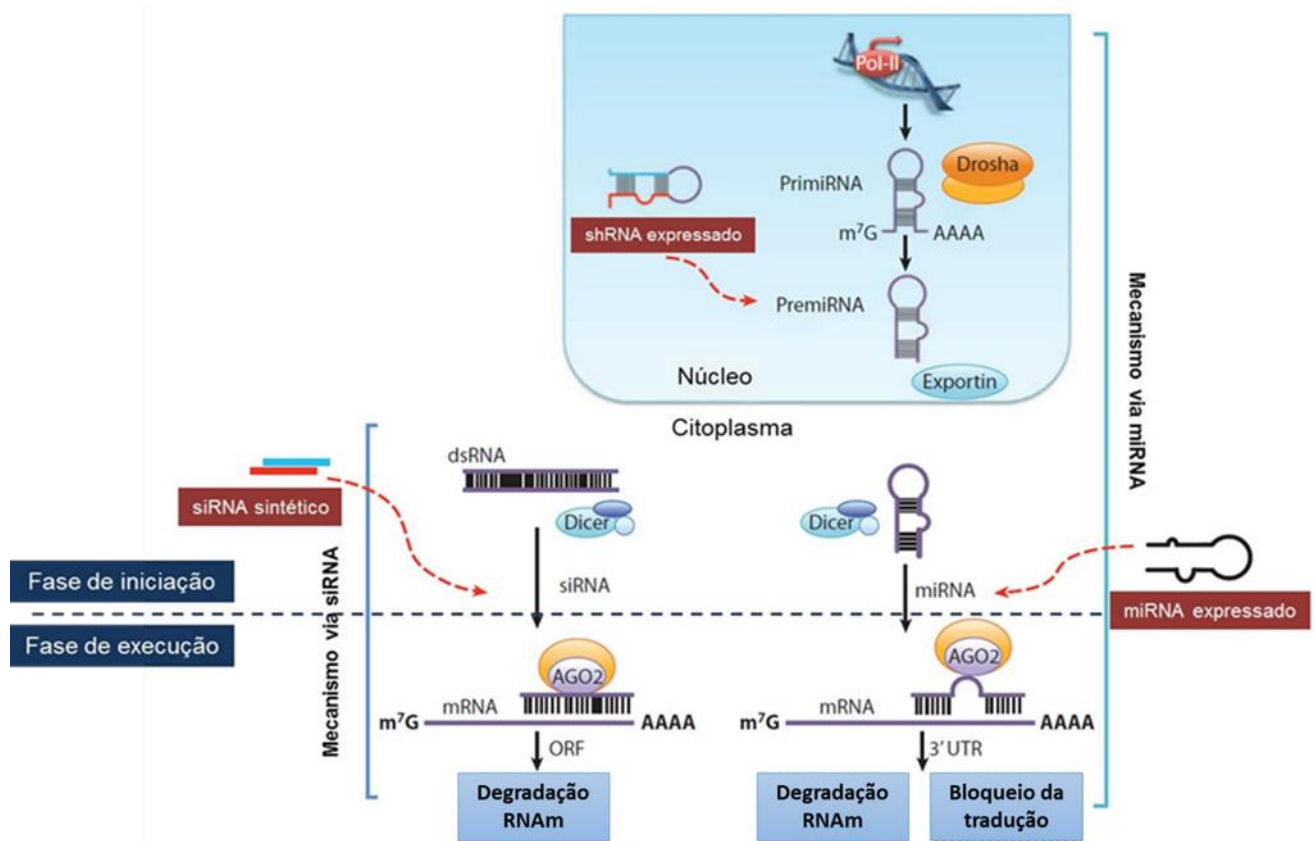
1996; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011; VAN DER KROL *et al.*, 1990).

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

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

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

Figura 1 – Mecanismo de interferência por RNA (RNAi)



Fonte: adaptado de Huang e Liu, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

1.2. Sistemas de liberação para veiculação de siRNA

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

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

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

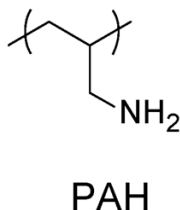
Os sistemas de liberação não virais normalmente são formados por complexos de polímeros e/ou lipídios catiônicos e siRNA. Essa classe foi desenvolvida para

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

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

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

Figura 2 - Estrutura molecular do polímero catiônico PAH



Fonte: Yoshida *et al.*, 2018.

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

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

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

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

1.3. Nanopartículas híbridas polímero-lipídicas (NPLs)

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

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

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

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

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

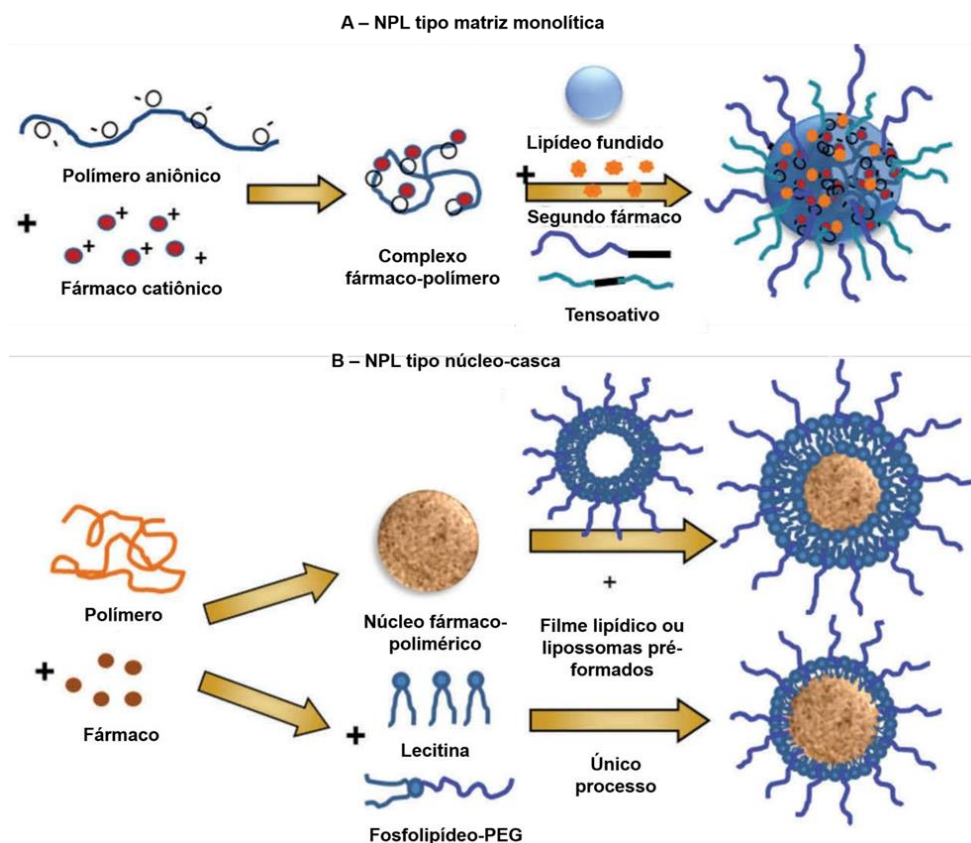
No início dos anos 2000, as primeiras NPLs foram relatadas, e esse sistema despertou interesse de pesquisadores que queriam solucionar problemas relacionados com a encapsulação de fármacos iônicos hidrossolúveis em matriz lipídica e procuravam uma alternativa para que esses princípios ativos fossem encapsulados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

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

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

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

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



Fonte: adaptado de Wu, 2016.

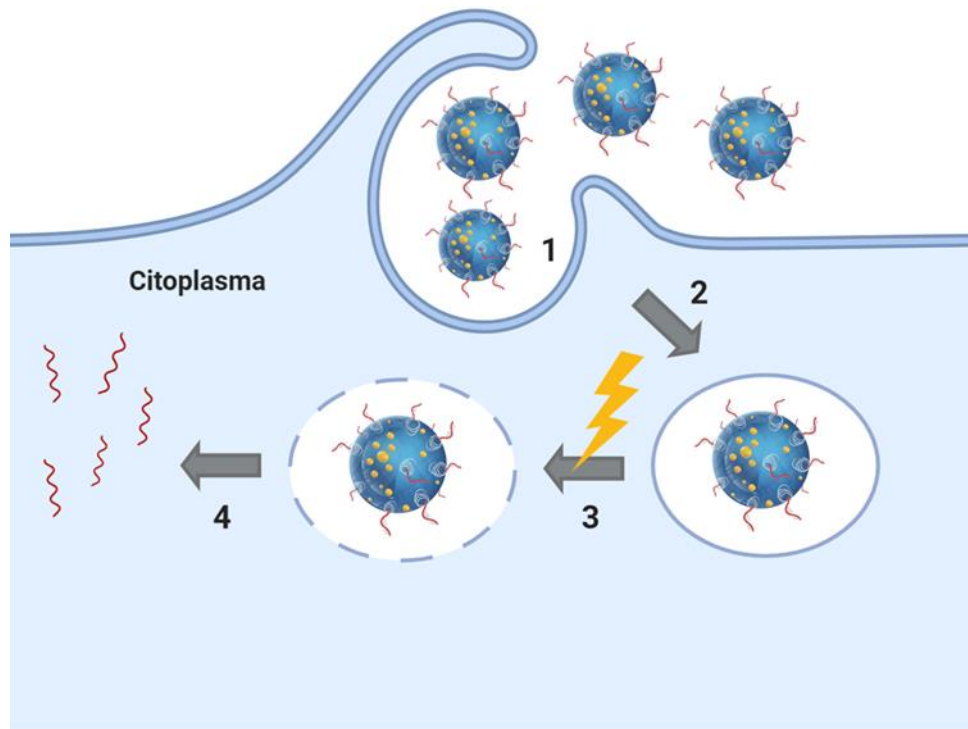
Nas NPLs de matriz monolítica, geralmente são utilizados polímeros aniônicos ou catiônicos que se complexam com fármacos de carga oposta aumentando a eficiência de encapsulação da partícula. Para a doxorubicina HCl ou verapamil HCl, que são fármacos catiônicos, por exemplo, pode ser utilizado um polímero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

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

1.4. Internalização fotoquímica

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

Figura 4 - Mecanismo da internalização fotoquímica no escape endossomal



Fonte: elaborado pela autora.

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

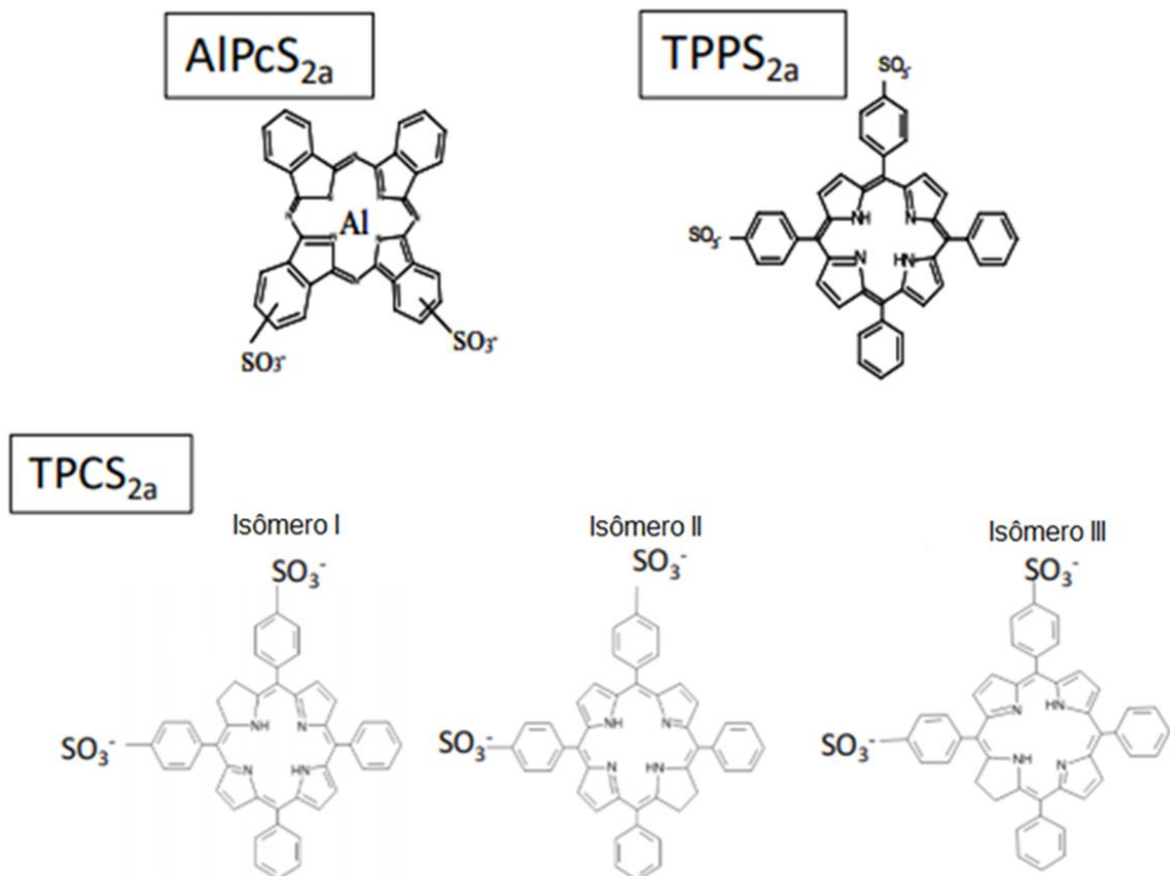
Após a exposição à luz, as EROs e o oxigênio singleto são formados nas membranas endossomais, onde o conteúdo de oxigênio é maior, fortalecendo o impacto nessas membranas que são o alvo principal desses produtos formados. O oxigênio singleto gerado permeabiliza as membranas endossomais, e o conteúdo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

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

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

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

Figura 5 - Principais fotossensibilizadores utilizados na internalização fotoquímica



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

Os FSs anfifílicos usados na internalização fotoquímica, como TPCS_{2a}, TPPS_{2a} e AIPcS_{2a}, tendem a ficar fortemente ligados às membranas das vesículas endossomais. Poucas enzimas, residentes na matriz dessas vesículas, são oxidadas pelo tratamento fotoquímico, embora alguma inativação já tenha sido relatada em

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

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

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

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

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

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

1.5. Psoríase

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

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

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

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

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

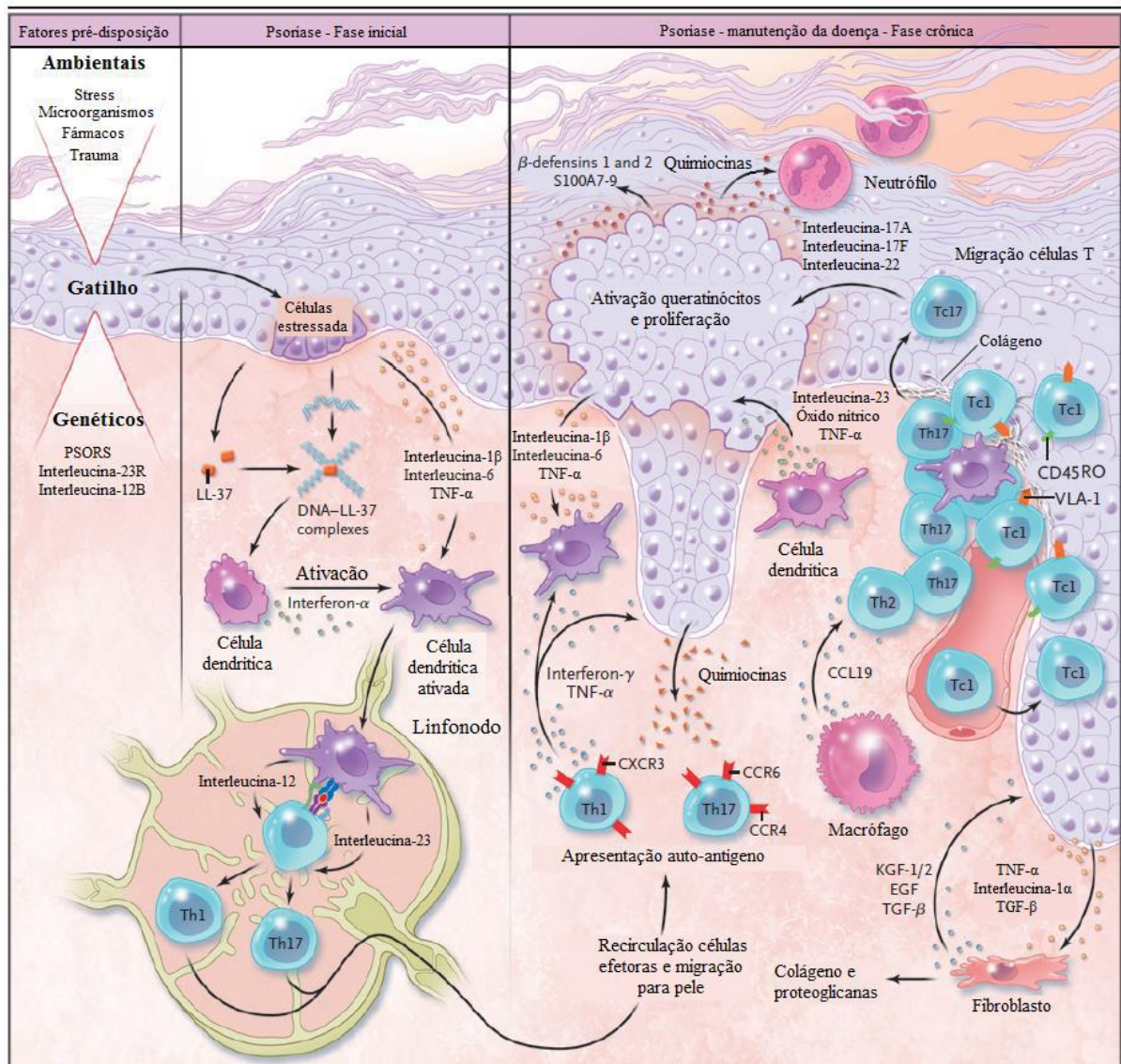
A imunopatogênese da psoríase envolve alterações no sistema imunológico inato (queratinócitos, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células endoteliais) e no sistema imunológico adquirido (linfócitos T), mediada por citocinas. Após a ativação imunocítica, há várias etapas pelas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

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

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

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

Figura 6 - Esquema evolutivo do quadro inflamatório característico da psoríase



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

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

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

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

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

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

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

1.6. Via de administração tópica para siRNAs

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

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

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

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

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

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

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

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

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Esta pesquisa visou o desenvolvimento de um sistema de liberação tópica de siRNA, baseado em nanopartículas híbridas polímero-lipídicas (NPLs), associando a internalização fotoquímica como proposta para a terapia tópica da psoríase.

2.1. Objetivos específicos

- a) desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificar o fotossensibilizador TPPS2a em cromatografia líquida de alta eficiência;
- b) planejamento experimental utilizando *Quality by Design* para obtenção das formulações de NPLs;
- c) obtenção das NPLs por homogeneização a quente, seguida de sonicação;
- d) encapsulamento do fotossensibilizador TPPS2a e complexação do siRNA nas NPLs;
- e) avaliação da estabilidade do complexo NPL-siRNA;
- f) caracterização das NPLs através da medição do tamanho, da carga superficial, da análise de rastreamento (NTA), análise da calorimetria (DSC) dos componentes e formulação e eficiência de encapsulamento;
- g) avaliação da viabilidade celular das NPLs em cultura celular de queratinócitos e fibroblastos;
- h) avaliação da captação celular do siRNA veiculado pelas NPLs em cultura celular de queratinócitos e fibroblastos por citometria de fluxo e microscopia confocal;
- i) avaliação da permeação e retenção cutâneas do TPPS2a e do siRNA veiculado pelas NPLs em modelo *in vitro* de pele de suínos;
- j) avaliação da eficácia do silenciamento do TNF- α em modelo *in vivo* de psoríase após o tratamento com as NPL-siRNA TNF- α por ELISA;
- k) avaliação das camadas da pele das amostras provenientes do ensaio *in vivo* por análise histológica.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas

- a) gliceril dibehenato (Compritol® 888 ATO) – amostra doada pela Gattefossé do Brasil (Barueri, SP, Brasil);
- b) Polaxamer 188 – Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EUA);
- c) poli(alilamina hidroclorada) PAH (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA);
- d) siRNA não específico (ns-siRNA) – Silencer Negative Control #1 siRNA (#AM4635) – Ambion (Austin, TX, USA) – *Applied Biosystems*;
- e) siRNA Tnf (Silencer® Select Pre-designed siRNA) – Ambion (Austin, TX, USA) – *Applied Biosystems*;
- f) siRNA Controle Alexa 647 Qiagen (Germantown, MD, EUA);
- g) Lipofectamina 2000 – Life Technologies (Paisley, Reino Unido);
- h) OPTI-MEM I + GLUTAMAX™ I 1X (Optimem) Ref 51985-026: Life Technologies (Paisley, Reino Unido);
- i) brometo de etídeo – *Sigma Aldrich Co.* (St Louis, MO, EUA);
- j) 4'6' – diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Prod nº 1306) – Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA);
- k) dietilpirocarbonato (DEPC) – *Sigma Aldrich Co.* (St Louis, MO, EUA);
- l) Fluoromount – *Sigma Aldrich Co.* (St Louis, MO, EUA);
- m) iodeto de propídeo – *Sigma Aldrich Co.* (St Louis, MO, EUA);
- n) paraformaldeído – *Sigma Aldrich Co.* (St Louis, MO, EUA);
- o) solução de antibiótico e antimicótico composta por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL – *Sigma Aldrich Co.* (St Louis, MO, EUA);
- p) tripsina-EDTA (0,25%) – *Sigma Aldrich Co.* (St Louis, MO, EUA);
- q) albumina do soro bovino (BSA) – MP Biomedical (Santa Ana, CA, EUA);
- r) meio de Cultura DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium – *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- s) soro bovino fetal inativado – Gibco® (Carlsbad, CA, EUA);
- t) Resazurin sodium salt – *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);

- u) dimetilsulfóxido, etanol, fosfato monossódico, fosfato dissódico, fosfato de sódio e xilol – Synth (Diadema, SP, Brasil);
- v) Tissue-Tec® OCT™ Compound – Sakura Fineteke (Torrance, CA, EUA);
- w) tris(hidroximetil) aminometano – Merck KGaA (Alemanha);
- x) UltraPure™ Agarose – Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA);
- y) Ultrafiltro de centrifugação Amicon® – Merck KGaA (Alemanha);
- z) kit ELISA para quantificação da interleucina TNF- α para camundongos – Affymetrix Ebioscience (EUA);
- aa) creme imiquimod 5% (Modik) – Germed (fabricado por EMS S/A, Hortolândia, Brasil);
- bb) água ultrapura obtida de sistema MiliQ – Merck Millipore (Alemanha);
- cc) parafina Histosec® - Merck KGaA (Alemanha).

3.1.2. Equipamentos e acessórios

- a) balança analítica – Acculab (Arvada, CO, EUA);
- b) célula de difusão de Franz modificada *in vitro* vertical – Hanson Instruments (EUA);
- c) dermatômetro Nouvag AG (Suíça);
- d) liofilizador Freezone 2.5 – Labconco (EUA);
- e) leitor de microplacas Synergy 2 – Biotek Instruments (Winooski, VT, EUA);
- f) citômetro de fluxo BD FACSCalibur® – BD Biosciences (EUA);
- g) microscópio confocal LEICA – TCS SP2; *software*: LAS-AF; equipado com *laser* Hene 633 nm (Buffalo Grove, IL, EUA);
- h) microscópio óptico equipado com filtro polarizador Axioplan 2 Image Pol – Carl Zeiss (Alemanha);
- i) cromatograma de alta eficiência da Shimadzu system com detector UV-vis – Kyoto, Japão;
- j) banho termostaticado Fanem (Guarulhos, SP, Brasil);
- k) centrifugas Eppendorf modelo 5430 R e 5810 R – Eppendorf (Alemanha);
- l) ZetaSizer Nano series, Nano-ZS – Malvern Instruments (Reino Unido);
- m) ZetaView® Nanoparticle Tracking Analysis modelo NS 300 (Alemanha);
- n) agitador mecânico tipo mixer – Ultra-Turrax IKA (Campinas, SP, Brasil);
- o) medidor de pH – Digimed (São Paulo, SP, Brasil);

- p) ultrassom de haste (SONICS – 750 Watt ultrasonic processor/ model No: VC (vibra cell) 750);
- q) chapa aquecedora;
- r) cuba eletroforética – Biorad;
- s) microscópio óptico de fluorescência modelo Axio Imager A1, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha), com software analisador de imagem AxioVision, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha);
- t) microscópio óptico de luz convencional (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha)
- u) micrótomo rotativo manual 820 Spencer Microtome – AO® American Optical (Buffalo, NY, EUA);
- v) criostato Leica CM 1850 – Leica Biosystems Inc. (Buffalo Grove, IL, EUA);
- w) incubadora;
- x) fluxo laminar;
- y) agitador tipo vórtex e magnético;
- z) DSC – Perkin Elmer, Jade DSC;
- aa) células de difusão de Franz - Hanson Instruments (EUA).

3.1.3. Células, tecidos e animais

- a) células imortalizadas de queratinócitos humanos – linhagem HaCaT (Banco de células do Rio de Janeiro) e células de fibroblastos de camundongos – linhagem BALB/3T3 clone A31 (Banco de células do Rio de Janeiro);
- b) amostras de pele frescas retiradas cuidadosamente da parte externa da orelha de suínos (recém-abatidos, Frigorífico Olhos d’água, Ipuã, São Paulo) com o auxílio de um bisturi, que posteriormente foram dermatomizadas em uma espessura de 500 µm, para então serem armazenadas a -20°C, sendo utilizadas dentro de 30 dias;
- c) camundongos sem pelo da linhagem HRS/J (laboratório Jackson - Bar Harbor, ME, EUA), com 4 a 6 semanas de idade, pesando entre 20 e 30 gramas.

3.2. Métodos

3.2.1. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificar o composto TPPS2a por CLAE

A quantificação do TPPS2a foi analisada por um método analítico desenvolvido e validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector ultravioleta (UV), de acordo com Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166. O método foi realizado com fase móvel gradiente composta por metanol/água e trietilamina (em uma proporção de 0,5%) em uma coluna C₁₈ (porosidade de 5 µm, comprimento de 100 mm). O gradiente da fase móvel variou de acordo com o tempo e a proporção de metanol, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 1 – Gradiente da fase móvel

Tempo (min)	% metanol
0	40
2	40
4	70
6	100
8	100
10	40

Fonte: elaborado pela autora.

O forno foi padronizado na temperatura de 40°C, o volume de analito injetado em cada medida foi de 20 µL, e a vazão foi de 0,8 mL/min. O comprimento de onda de detecção do TPPS2a foi de 420 nm, de acordo com a literatura (LILLETVEDT *et al.*, 2011). Para validação do método desenvolvido, foram feitas 5 concentrações diferentes do TPPS2a – 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 µg/mL –, que foram diluídas em metanol. Foram realizados os testes de linearidade, precisão e exatidão (intra e interensaio), limite de quantificação e de detecção, seletividade e robustez. O método desenvolvido foi utilizado no ensaio de eficiência de encapsulamento e na análise de permeação cutânea *in vitro*.

3.2.2. Planejamento experimental das formulações utilizando Box-Behnken (Quality by Design)

Para melhor planejamento das formulações utilizando o *Quality by Design* (QbD), foi utilizado um planejamento quadrático independente nomeado Box-Behnken, que possui três fatores e três níveis, com o auxílio do *software* Minitab (SAS,

SAS Institute, Cary, NC, EUA). Os fatores independentes e as variáveis dependentes usadas neste projeto estão listados na Tabela 2. As quantidades (em porcentagem) de Poloxamer 188, do polímero catiônico PAH e o tempo de sonicação usados para preparar cada uma das 15 formulações também constam na Tabela 2. Após gerar as equações polinomiais relacionando as variáveis dependentes e independentes, o processo foi otimizado para o menor valor de Pdl e o potencial zeta mais positivo. A otimização foi realizada usando uma função de conveniência para obter os níveis de X1, X2 e X3 (variáveis independentes), o que minimizou o Pdl, enquanto aumentou o valor do potencial zeta.

Tabela 2 – Variáveis do planejamento Box-Behnken

Variáveis independentes descodificadas	Níveis		
	Baixo	Médio	Alto
X1: Quantidade de Poloxamer (%)	0,5	1	1,5
X2: Quantidade de PAH (%)	0,1	0,25	0,5
X3: Tempo de sonicação (min)	5	10	15
Variáveis independentes codificadas	Níveis		
	Baixo	Médio	Alto
X1: Quantidade de Poloxamer	-1	0	1
X2: Quantidade de PAH	-1	0	1
X3: Tempo de sonicação	-1	0	1
Variáveis dependentes	Nível		
	Objetivo		
Y1: Pdl	Menor		
Y2: Potencial zeta	Maior		

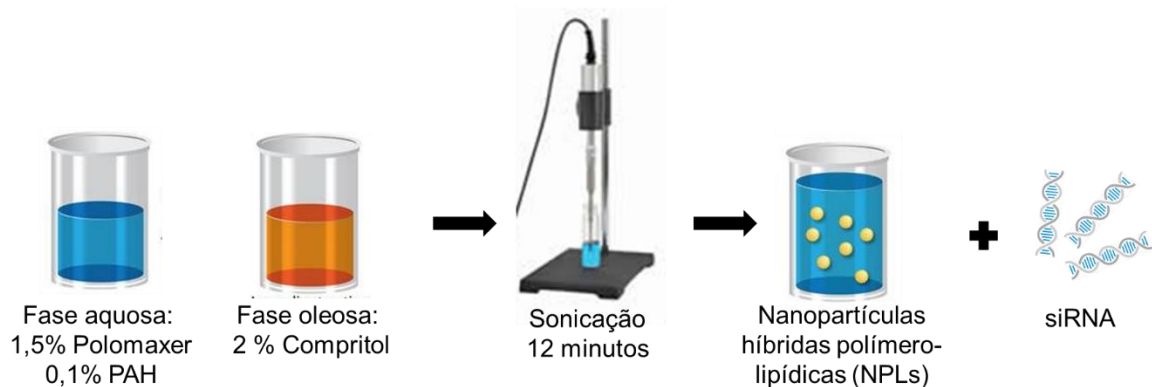
Fonte: elaborado pela autora.

Os parâmetros escolhidos (variáveis dependentes) foram verificados entre as 15 formulações para que se obtivesse uma formulação otimizada. A partir desses resultados, o *software* foi capaz de gerar uma formulação que contivesse os melhores parâmetros escolhidos (Y1 e Y2), qual foi: 2% de Compritol® 888 ATO; 0,1% de PAH e 1,5% de Polaxamer 188 em um tempo de sonicação de 12 minutos.

3.2.3. Obtenção das nanopartículas híbridas polímero-lipídicas (NPLs)

O preparo das NPLs foi realizado através da técnica de homogeneização a quente empregando um homogeneizador de alto cisalhamento (sonicador). A fase lipídica foi composta pelo lipídio sólido Compritol® 888 ATO, e a fase aquosa, pelo polímero catiônico polialilamina hidrocloreto (PAH) e um surfactante, Polaxamer 188 (P188), preparada em água livre de RNase (água com dietilpirocarbonato – água DEPC). A fase aquosa e a fase oleosa foram aquecidas, em um banho, em béqueres separados, até a temperatura de fusão do lipídio sólido (em torno de 75°C). A fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, na qual foi formada instantaneamente uma emulsão, que foi dispersa com a ajuda de um homogeneizador de ultrassonicação. Após 12 minutos de sonicação, a formulação foi resfriada em banho de gelo e acondicionada em frascos adequados (Figura 7).

Figura 7 - Esquema do método para obtenção das NPLs



Fonte: elaborado pela autora.

3.2.4. Encapsulamento do composto TPPS2a nas NPLs

Para a aplicação da internalização fotoquímica juntamente com a terapia gênica *antisense*, foi escolhido um composto fotossensibilizador capaz de ser excitado em um específico comprimento de onda. Para este estudo, o composto dissulfonato de meso-tetrafenil-porfirina (TPPS2a), da classe das porfirinas, foi o fotossensibilizador (FS) escolhido, devido a outros estudos positivos já realizados pelo grupo. O FS foi previamente dissolvido em um pequeno volume de dimetilsulfóxido

(DMSO), para uma proporção final de 10%, e depois diluído em tampão fosfato-salino (PBS) até uma concentração final de 2 mg/mL. O FS foi incorporado na fase aquosa na concentração de 100 µg/mL, juntamente com o polímero PAH e o Polaxamer 188.

3.2.5. Ensaios realizados em gel de eletroforese

Preparo do gel de agarose 2%

Para o preparo do gel foi utilizado 1,2 g de agarose em 60 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA pH 8,0 (TAE); essa mistura foi aquecida em micro-ondas por aproximadamente 2 minutos para promover completa solubilização da agarose. Após resfriamento, adicionou-se um volume de 5 µL de brometo de etídeo (5 mg/mL). O gel foi vertido na placa de corrida e mantido a temperatura ambiente até sua total polimerização e resfriamento. O tampão TAE também foi utilizado para realizar as corridas eletroforéticas das amostras. As corridas foram processadas em cuba horizontal contendo o tampão TAE, sob uma voltagem de 100 V, durante 20 minutos. Para visualização das bandas, os géis foram submetidos a luz ultravioleta. O volume de amostra utilizado nos ensaios com gel foi de 30 uL por poço.

3.2.5.1. Incorporação e determinação da capacidade de complexação do siRNA nas NPLs

Após o preparo das NPLs, o siRNA foi adicionado cuidadosamente na concentração final de 10 µM, previamente empregada em trabalhos do grupo (VICENTINI *et al.*, 2013a; PETRILLI *et al.*, 2016), e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. O estudo para avaliar a capacidade das NPLs em complexar o siRNA foi realizado por meio da eletroforese em gel de agarose 2%. Foram analisadas as amostras de siRNA livre em água DEPC (10 µM) como controle positivo; apenas as NPLs (como controle negativo); e as NPLs complexadas com siRNA (10 µM).

3.2.5.2. Avaliação da descomplexação do siRNA das NPLs

Para avaliar a capacidade de descomplexação do siRNA das nanopartículas de forma intacta, foi feito o método de competição com os poliânions de heparina (Qi *et al.*, 2012). Essa avaliação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2%. Os protocolos de preparo do gel e da corrida eletroforética foram os mesmos descritos no item 3.2.5. Foram analisadas as amostras de siRNA livre em água DEPC (10 μ M) como controle positivo; as NPLs complexadas com siRNA (10 μ M) sem heparina; e as NPLs complexadas com siRNA (10 μ M) com heparina. Neste estudo, 10 μ L de heparina (50.000 UI/mL) foram adicionados nas amostras de NPLs + siRNA. Esse sistema foi mantido em repouso em banho termostaticado por 1 hora, a 37°C. Após esse tempo, as amostras foram adicionadas no gel de agarose e submetidas a corrida eletroforética.

3.2.6. Caracterização das NPLs

3.2.6.1. Análise do diâmetro médio hidrodinâmico e índice de polidispersão das partículas

Foi utilizada a técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS) para a análise do diâmetro médio hidrodinâmico e distribuição de tamanho das partículas. As NPLs isentas e contendo TPPS2a (100 μ g/mL) foram diluídas em água Milli-Q na proporção de 1:400 v/v e colocadas em cubetas de poliestireno de 1 cm de caminho óptico. Então foram submetidas às análises no equipamento Zetasizer Nano system ZS, e as medições foram realizadas a 25°C e em triplicata. O equipamento é equipado com um *laser* de HeNe de 4 mW, operando em um comprimento de onda de 633 nm, e realiza as medições por retroespalhamento de luz sob o ângulo de detecção de 173°.

A distribuição de tamanho das partículas foi avaliada por determinação do índice de polidispersão (Pdl), que é a medida adimensional da amplitude de distribuição das partículas, variando de 0 a 1. Quanto mais próximo do valor de zero, mais homogêneo é o tamanho das partículas.

3.2.6.2. Medida da carga superficial das partículas

A carga superficial das NPLs foi medida como potencial zeta, que é determinado pela mobilidade eletroforética das partículas dispersas através da aplicação de um campo elétrico. As amostras da formulação de NPL isentas e contendo TPPS2a (100 µg/mL) foram diluídas em uma solução de cloreto de potássio (KCl a 0,1M) na proporção de 1:400 v/v e submetidas às análises no Zetasizer Nano system ZS. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.6.3. Análise de rastreamento das NPLs (*Nanoparticle Tracking Analysis – NTA*)

A análise de rastreamento foi realizada no equipamento ZetaView® com o objetivo de verificar o diâmetro e a concentração das nanopartículas em determinado volume. As amostras foram diluídas em água Milli-Q na proporção de 1:30000 v/v e injetadas no compartimento de amostras com seringas estéreis. A captura e análise dos dados foi realizada no *software* ZetaView 8.02.26. Vídeo das amostras foi capturado por câmera EMCCD 215S, com ajustes manuais para melhoramento da imagem. Todas as medições foram realizadas em triplicata e a temperatura ambiente.

3.2.6.4. Análise da calorimetria diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimetry - DSC*)

A análise da calorimetria diferencial de varredura determinou o ponto de fusão, variações de entalpia e possíveis interações entre os componentes da formulação. Esse ensaio foi realizado em um equipamento DSC com amostra da formulação liofilizada, e seus componentes, também no estado sólido. Para a liofilização, os materiais foram todos primeiramente congelados para, então, serem liofilizados. As amostras foram seladas em panelinhas de alumínio e aquecidas de 20 a 240°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio. O índice de recristalização (IR) foi calculado pela seguinte equação:

$$IR (\%) = \frac{\Delta H_{NPLs}}{(\Delta H_{compritol} \times fração\ lipidica)} \times 100$$

3.2.6.5. Eficiência de encapsulamento do TPPS2a nas NPLs

A eficiência de encapsulação foi avaliada por método indireto (ALDAYEL *et al.*, 2018; CAVALCANTI *et al.*, 2018). Esse método é baseado na centrifugação da formulação em dispositivo de ultrafiltração constituído de celulose regenerada. Foi utilizado um ultrafiltro de 50 kDa (Amicon – Millipore®) com volume de 1 mL de amostra em uma concentração de 5 µg/mL, que foi centrifugada por 20 minutos a 6000 g em temperatura de 10°C. Após esse processo, o filtrado foi quantificado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A centrifugação, juntamente com o auxílio do filtro, é capaz de separar o FS livre (não encapsulado), que consegue atravessar a membrana de celulose, do que está encapsulado. Assim, a eficiência pode ser determinada por quantificação indireta (COLA, 2016) do princípio ativo, através da diferença entre a quantidade total de ativo adicionado na formulação (100%) e a quantidade livre (não encapsulada), de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ encapsulada} = \frac{(\text{total de FS} - \text{porção não encapsulada})}{\text{total de FS}} \times 100$$

O filtrado (não encapsulado) de TPPS2a foi quantificado a partir do método analítico desenvolvido neste trabalho.

3.2.7. Avaliação da viabilidade celular

3.2.7.1. Linhagem e cultivo celular

A citotoxicidade das nanopartículas foi avaliada em cultura celular de células imortalizadas de queratinócitos humanos, linhagem HaCaT, e células de fibroblastos de camundongos, linhagem BALB/3T3 clone A31. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 1% (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico, composta por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL, e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado a 37°C com 5% de CO₂, em condições normais de cultivo. As células foram subcultivadas a cada 2 ou 3 dias, usando tampão PBS (pH 7,5) estéril para lavá-las e tripsina estéril 5% (v/v) para desagregá-las do frasco. Após a desagregação, as células foram centrifugadas a 129

g por 5 minutos, e ressuspendidas em meio de cultivo. O número de células viáveis para o cultivo e plaqueamento foi determinado através da homogeneização de uma alíquota da suspensão celular com a quantidade equivalente de solução de Azul de Tripán a 0,4%; as células foram contadas em câmara de Neubauer através de um microscópio óptico, e excluíram-se as células que incorporaram o corante (não viáveis).

3.2.7.2. Tratamentos

Foram feitos tratamentos com as NPL e NPL-TPPS2a. Primeiramente, as células foram tratadas apenas com a formulação de NPL em diferentes concentrações, foram feitas 7 diluições seriadas de 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:1600 e 1:3200 (v/v) durante um tempo de incubação de 4 horas. Foram feitos os controles positivo (tratamento com DMSO, controle de morte) e negativo (tratamento apenas com DMEM, controle de vida).

Para os ensaios com a formulação NPL-TPPS2a, foram feitos tratamentos envolvendo, além da formulação, luz no comprimento de onda de excitação do FS (420 nm). Por causa disso, vários controles foram feitos para verificar os possíveis efeitos tóxicos do FS livre e encapsulado no escuro e com irradiação. A dose energética de luz foi testada juntamente com as NPLs, bem como sozinha (para verificação do efeito da luz na cultura celular). Os controles foram estabelecidos da seguinte forma:

- a) avaliação da cultura de células sem tratamento apenas com meio de cultura DMEM;
- b) avaliação da cultura de células sem tratamento e com irradiação, a fim de verificar possíveis danos celulares causado pela irradiação;
- c) avaliação da solução aquosa de TPPS2a na ausência e presença de irradiação;
- d) avaliação da formulação contendo TPPS2a (NPL-TPPS2a) na ausência e presença de irradiação.

A concentração de FS e a dose energética utilizada não foram altas, pois não é intuito deste estudo a avaliação da atividade fotodinâmica do FS, por isso, com base em pesquisas publicadas na área de internalização fotoquímica, a dose energética testada foi de 0,81 J/cm². A irradiação foi feita através de um equipamento constituído de LEDs (*light emitting diodes*) para iluminação de placa de cultura celular,

desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico – LAT/USP (Instituto de Física de São Carlos, IFSC) do grupo de Óptica do Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato. A formulação NPL-TPPS2a foi testada em 2 tempos de incubação: além de 4 horas, também foi avaliado o tempo de 18 horas, baseado em estudos prévios com internalização fotoquímica envolvendo cultura celular (BERSTAD *et al.*, 2015).

3.2.7.3. Viabilidade celular por redução da resazurina

A avaliação da viabilidade foi realizada pelo método de redução da resazurina por fluorescência. As células foram inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células/poço para a linhagem HaCaT e 1×10^4 células/poço para a linhagem BALB/3T3 durante 24 horas. O tratamento foi realizado tanto para as NPLs quanto para as NPL-TPPS2a, juntamente com os seus controles. Ao final do tratamento, a solução de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido, 0,1 mg/mL) foi colocada em cada poço e deixada durante 4 horas. As placas foram lidas em leitor de placa Synerg 2, onde o sinal de fluorescência da resazurina foi determinado (excitação: 530/25, emissão: 590/35). A viabilidade foi calculada normalizando a fluorescência das amostras com a do controle (tratadas apenas com DMEM).

3.2.8. Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pelas NPLs em cultura celular

3.2.8.1. Linhagem e cultivo celular

Os ensaios de captação celular também foram realizados em cultura celular de células imortalizadas de queratinócitos humanos, linhagem HaCaT, e células de fibroblastos de camundongos, linhagem BALB/3T3 clone A31. O protocolo de cultivo celular foi o mesmo descrito no item 3.2.7.1.

3.2.8.2. Tratamento

A formulação NPL foi diluída em PBS estéril a uma concentração viável (definida a partir do ensaio de viabilidade celular) e posteriormente incubada por 30

minutos com siRNA marcado com Alexa-Fluor 647 (siRNA-Alexa 647) em uma concentração final de 40 pmol por poço. As células sem tratamento, com siRNA-Alexa em água livre de RNase e Lipofectamine® 2000 (utilizada para estudar e comparar a captação celular dos demais complexos), foram utilizadas como controles. Após 24 horas do plaqueamento celular, o meio de cultura foi renovado, e as células foram tratadas com as formulações por 4 horas a 37°C, com 5% CO₂. Após esse tempo de incubação, as células foram processadas para a avaliação da captação celular das moléculas de siRNA.

3.2.8.3. Avaliação da captação celular do siRNA por citometria de fluxo

As células em estudo foram inoculadas em placas de 12 poços a uma densidade de 3×10^5 células/poço para os queratinócitos e $1,25 \times 10^5$ células/poço para os fibroblastos. Após o tratamento de 4 horas, as células foram lavadas com solução PBS estéril, tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura. As células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando um Citômetro Facscanto BD FACSCalibur™ equipado com 3 *lasers* (488, 633 e 405 nm) e um filtro de emissão de 660/10 nm para o Alexa flúor®. Foi utilizado iodeto de propídeo (50 µg/mL) como indicador de viabilidade celular. A taxa de transfecção celular foi quantificada pela porcentagem de células positivas para o fluorocromo Alexa 647. Foram coletados 10.000 eventos por amostra analisada.

3.2.8.4. Avaliação da captação celular do siRNA por microscopia confocal de varredura a *laser*

Células de queratinócitos e fibroblastos foram inoculadas em placas de 24 poços crescidas de uma lamínula, previamente tratada com glutaraldeído, a uma densidade de 1×10^4 células/poço e 3×10^4 células/poço respectivamente, para os ensaios de captação celular por microscopia confocal. Nesse estudo, além das NPLs, foi testada a formulação NPL-TPPS2a, que também possui fluorescência (devido a presença do FS). Após o tempo de tratamento de 4 horas, cada poço foi lavado com PBS e adicionaram-se 500 µL da solução de paraformaldeído 4% (diluída em PBS) por 1 minuto. Passado esse tempo, os poços foram novamente lavados duas vezes com tampão PBS, as lamínulas foram retiradas dos poços e coladas em lâminas de

vidro com Fluoromount. Uma solução contendo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) em uma concentração de 3 µg/mL foi gotejada sobre as lâminas e deixada por 10 minutos. Após esse intervalo, as lâminas foram lavadas com tampão PBS e guardadas, fora do alcance de luz, em geladeira até o dia seguinte. Após completa secagem, as lâminas foram visualizadas sob microscopia confocal de varredura a *laser* (Microscópio Confocal LEICA – TCS SP2; *software*: LAS-AF) acoplada a uma câmera fotográfica, utilizando as objetivas convenientes e filtro de comprimento de onda de excitação adequado para cada componente. Foram utilizados 3 canais de *lasers*: um canal com comprimento de onda de excitação no 405 nm e emissão no 414 nm a 571 nm, específico para o Alexa 647; outro canal com comprimento de onda de excitação no 638 nm e emissão no 787nm a 800nm, específico para o DAPI; e outro canal com comprimento de onda de excitação no 552 nm e emissão no 581 nm a 646 nm, específico para o TPPS2a. A Lipofectamine® 2000 foi utilizada como controle positivo de transfecção celular nesse ensaio.

3.2.9. Avaliação *in vitro* da retenção cutânea do siRNA e permeação do TPPS2a veiculado pelas NPLs em modelo de pele de suínos

Preparação das peles em células de difusão de Franz

A retenção do siRNA e a permeação do TPPS2a foram avaliadas através do uso de um modelo de membrana biológica que utiliza peles de orelha de suínos montadas em células de difusão de Franz, como descrito por Lopes *et al.* (2006). As orelhas foram dissecadas, dermatomizadas a 500 µm e montadas em células de difusão de Franz com área de difusão de 1,77 cm² (PRAÇA *et al.*, 2018). O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato isotônico (0,01 M, pH 7,4) e mantido a 32°C, simulando a temperatura da superfície da pele (KARPANEN *et al.*, 2008) sob constante agitação (300 rpm). O estudo foi conduzido por 24 horas com n=5 para cada tratamento. Foram feitas análises quantitativas e qualitativas.

3.2.9.1. Avaliação quantitativa da permeação do TPPS2a veiculado pelas NPLs por CLAE

A quantificação do TPPS2a permeado através da pele foi feita por cromatografia (CLAE). Foram testadas duas amostras, a formulação contendo TPPS2a (100 µg/mL), NPL-TPPS2a, e a solução diluída em tampão PBS de TPPS2a, também a 100 µg/mL, que foram colocadas no compartimento doador das células de difusão de Franz. Este estudo foi realizado em condições *sink* com dose infinita por 24 horas. Uma amostra de 1 mL foi recolhida do compartimento receptor em tempos determinados (1/2; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 12; 15; 18; 21 e 24 horas) e lida em cromatógrafo (CLAE) para quantificar a concentração de TPPS2a permeada. Os resultados foram plotados em um gráfico que relaciona a quantidade de TPPS2a permeada/área de exposição em função do tempo. Após intervalo de 24 horas, as amostras de pele foram retiradas das células de difusão de Franz, e submetidas à retirada do estrato córneo usando fita adesiva (*tape stripping*). Foi feito um total de 12 fitas, que foram colocadas em um tubo com 3 mL de metanol para extração do TPPS2a da fita adesiva, e homogeneizadas. Essa solução foi filtrada em membrana filtrante, e o filtrado obtido, submetido à quantificação do TPPS2a por CLAE. O restante da pele foi picotado e colocado em tubo com 3 mL de metanol, submetido ao triturador de tecidos e banho de ultrassom por 20 minutos, obtendo uma solução homogênea de pele, a qual foi filtrada em membrana filtrante (poro de 0,22 µm), sendo feita em seguida a quantificação do TPPS2a. Os resultados foram expressos em quantidades de TPPS2a retidas no estrato córneo (extração das fitas adesivas) e na epiderme viável + derme.

3.2.9.2. Avaliação da retenção cutânea do siRNA por microscopia confocal

A retenção cutânea do siRNA foi investigada mediante o uso do siRNA-Alexa 647 (fluorescente) por microscopia confocal. Peles de orelha de suínos foram montadas em células de difusão de Franz, como descrito no item 3.2.9. No compartimento doador, foi aplicada a formulação NPL-TPPS2a (100 µg/mL de TPPS2a) com siRNA-Alexa 647 (50 µM), uma solução de TPPS2a (100 µg/mL), e os controles: solução tampão contendo siRNA-Alexa 647 livre e solução tampão fosfato. Após 24 horas da aplicação, o excesso de tratamento foi retirado cuidadosamente com papel absorvente, e as peles foram removidas das células de difusão de Franz, congeladas em matriz O.C.T. (Tissue Tek®) e seccionadas transversalmente em

criostato a -20°C . Foram obtidos cortes histológicos verticais de 20 μm de espessura, montados em lâminas de vidro gelatinizadas.

Após esse procedimento, foi gotejada uma solução DAPI na concentração de 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em cima dos cortes, e depois de 10 minutos, os cortes foram lavados com PBS. As lamínulas foram coladas com Fluoromount nas lâminas e deixadas *overnight* dentro da geladeira. As lâminas foram analisadas no dia seguinte em microscópio confocal de varredura a *laser* acoplado a uma câmara fotográfica, utilizando a objetiva de 20x. Foram utilizados 3 canais de *laser*: canal 1 com comprimento de onda de excitação no 405 nm e emissão no 414 nm a 571 nm, específico para o Alexa 647; canal 2 com comprimento de onda de excitação no 638 nm e emissão no 787 nm a 800 nm, específico para o DAPI; e canal 3 com comprimento de onda de excitação no 552 nm e emissão no 581 nm a 646 nm, específico para o TPPS2a. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz.

3.2.10. Avaliação da eficácia do silenciamento do TNF α em modelo *in vivo* de psoríase após o tratamento com siRNA-TNF α veiculado pelas NPLs

3.2.10.1. Animais

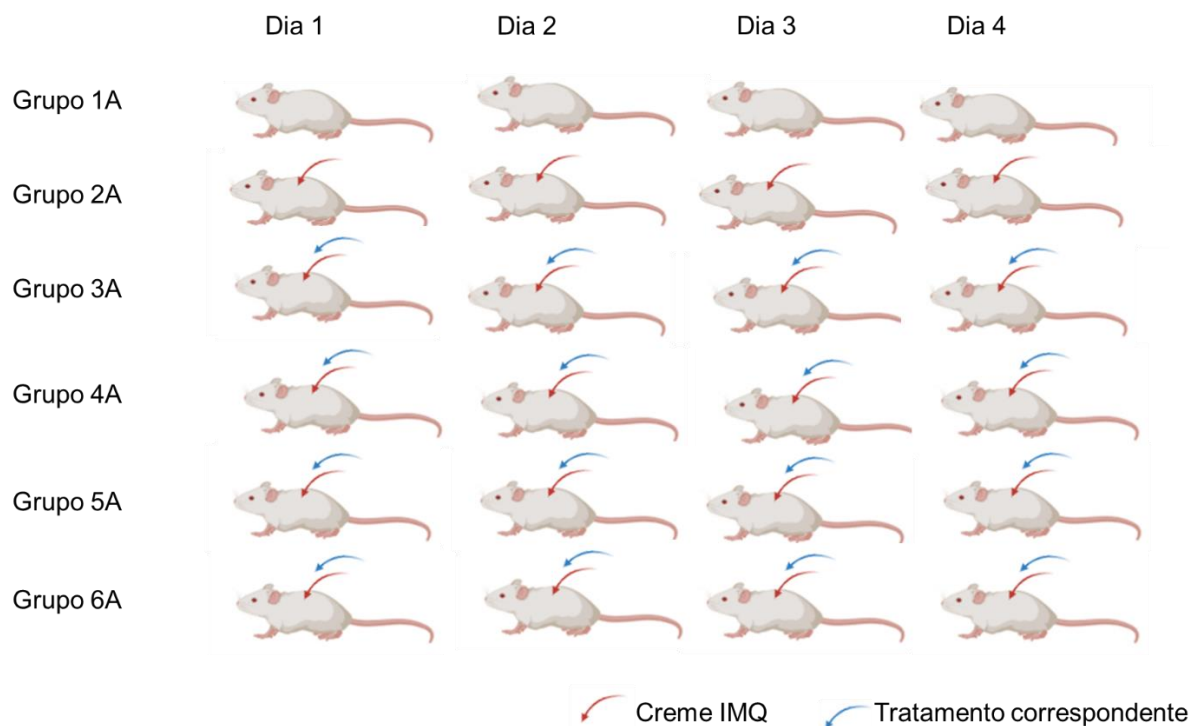
Os estudos *in vivo* foram conduzidos utilizando camundongos (fêmeas e machos) isogênicos *Hairless* da linhagem HRS/J, adultos (6 – 8 semanas de vida). Os animais foram criados no Biotério da FCFRP-USP, mantidos a 20 – 25 $^{\circ}\text{C}$, com livre acesso a água e alimento, 4 trocas de ar/h e ciclos claro/escuro de 12h. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto-USP (protocolo nº 19.1.135.60.7).

3.2.10.2. Indução da psoríase e esquema terapêutico

Para determinar o efeito do siRNA TNF α incorporado nas NPLs sobre a expressão de TNF- α , citocina pró-inflamatória que apresenta expressão elevada na doença psoríase, foi utilizado um modelo de psoríase *in vivo* induzido por imiquimod (IMQ) descrito por Van der Fits *et al.* (2009).

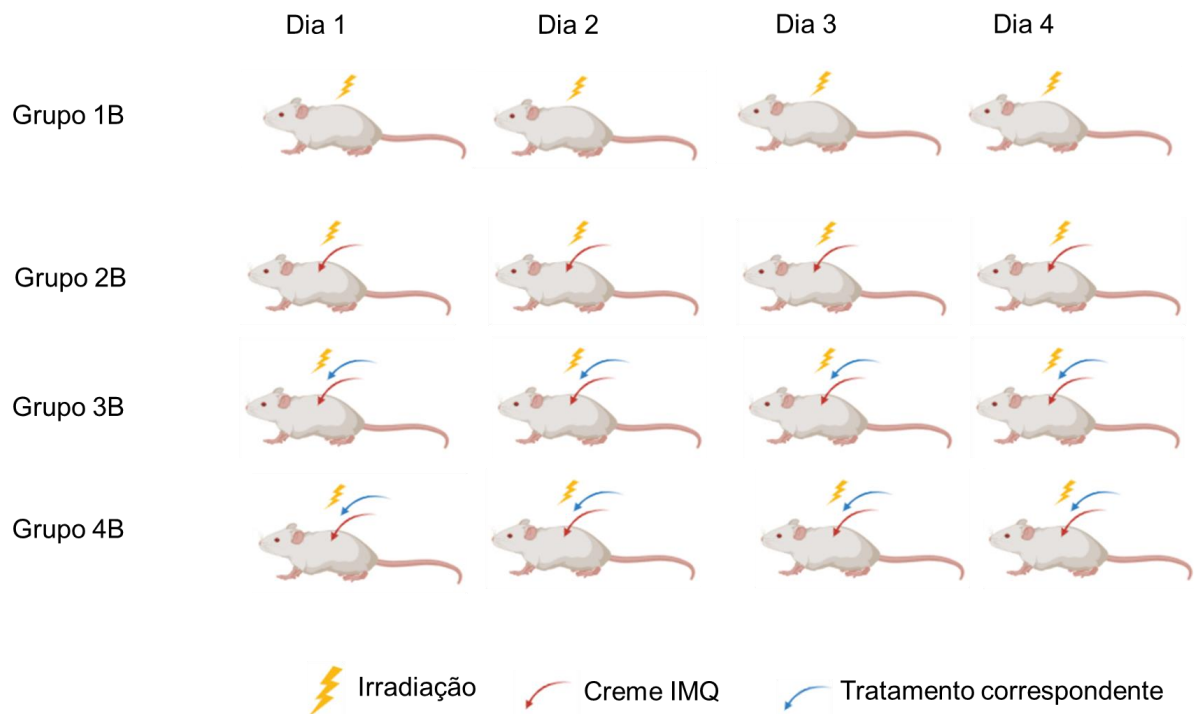
Para a indução da psoríase experimental, os animais receberam uma dose tópica diária (65 mg) de creme imiquimod 5%, que foi cuidadosamente espalhada no dorso de cada animal por 4 dias consecutivos, resultando em uma dose diária de 3,25 mg do composto ativo (IMQ). O grupo controle sadio não recebeu nenhum tipo de tratamento ou indução. Os animais foram divididos em dois grandes grupos – (A) Ausência de irradiação e (B) Presença de irradiação –, que estão apresentados nas Figuras 8 e 9, onde o grupo sadio (controle negativo) é referente aos animais que não receberam nem tratamento nem indução da doença, e o grupo doente (controle positivo) é referente aos animais que foram induzidos com creme imiquimod a apresentarem a doença.

Figura 8 - Esquema do protocolo feito no ensaio *in vivo* sem irradiação (escuro)



Fonte: elaborada pela autora.

Grupo 1A (animais saudáveis) sem creme IMQ e sem tratamento (controle negativo); grupo 2A (IMQ, psoríase), creme IMQ e sem tratamento (controle positivo); grupo 3A (IMQ + 100 μ L de NPL-TPPS2a-TNF α); grupo 4A (IMQ + 100 μ L de NPL-TPPS2a); grupo 5A (IMQ + 100 μ L de NPL-TNF α); grupo 6A (IMQ + 100 μ L de siRNA TNF α em solução aquosa). (n = 3). Cada camundongo recebeu o equivalente a 300 μ M/kg de siRNA TNF α

Figura 9 - Esquema do protocolo feito no ensaio *in vivo* com irradiação

Fonte: elaborado pela autora.

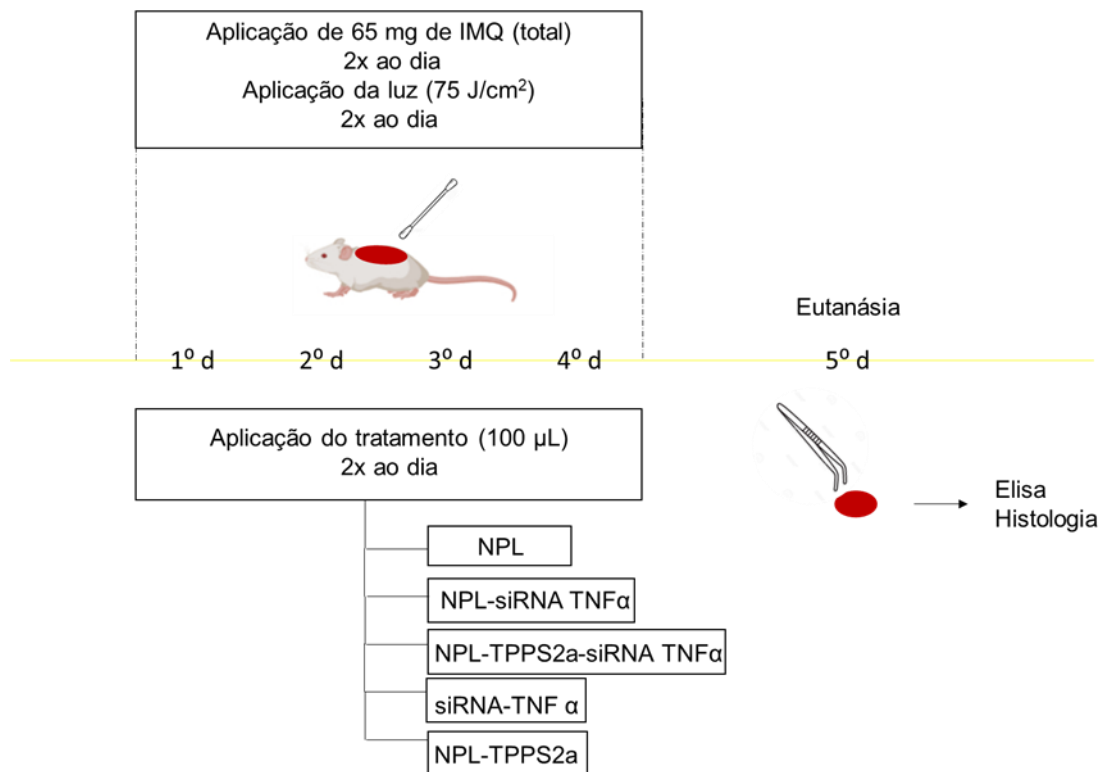
Grupo 1B (animais saudáveis) sem creme IMQ e irradiação de 75 J/cm² (controle negativo); grupo 2B (IMQ, psoríase), creme IMQ e irradiação de 75 J/cm² (controle positivo); grupo 3B (IMQ + 100 µL de NPL-TPPS2a-TNFα + irradiação 75 J/cm²); grupo 4B (IMQ + 100 µL de NPL-TPPS2a + irradiação 75 J/cm²). (n = 3). Cada camundongo recebeu o equivalente a 300 µM/kg de siRNA TNFα.

O protocolo de tratamento (Figura 10) consistiu na aplicação de 65 mg de IMQ (2x/dia) e de 100 µL de cada respectiva formulação (2x/dia), com 1 hora de intervalo entre os tratamentos, buscando evitar possíveis interações entre o IMQ e os demais componentes (NPL, TPPS2a e siRNA). Os grupos tratados com luz foram submetidos a este tratamento após 2 horas da aplicação das formulações. Ao longo do período de indução e tratamento da psoríase, os animais foram fotografados diariamente para o acompanhamento da evolução do quadro psoriático induzido pelo creme IMQ, além de serem pesados a fim de se acompanhar o seu bem-estar. A dose energética escolhida para ser utilizada em cada grupo foi de 75 J/cm², referente a trabalhos publicados na área de internalização fotoquímica (OLIVEIRA; HOGSET; STORM, 2008).

No 5º dia, os animais foram submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica (isoflurano 5%). A pele dorsal foi removida cuidadosamente e dividida em 2 partes: (I) determinação dos níveis de TNFα por ELISA; e (II) análise histológica (visualização da migração de células inflamatórias e de alterações nas camadas da

pele). As peles utilizadas para o ensaio de ELISA foram congeladas e armazenadas a -80°C ; já as peles utilizadas para histologia foram colocadas em formol 10% tamponado (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) por 24 horas. Após esse tempo, foram transferidas para uma solução de álcool 70% e mantidas até o início da produção das lâminas (máximo de 30 dias).

Figura 10 - Esquema simplificado do protocolo experimental de indução de psoríase com creme IMQ associado aos tratamentos e posteriores análises



Fonte: elaborado pela autora.

3.2.10.3. Avaliação da eficácia do siRNA TNF α veiculado pelas NPLs por meio da quantificação de TNF- α por ELISA

Para a dosagem da interleucina TNF α , a pele do dorso dos animais foi coletada e armazenada a -80°C para posterior análise. As amostras de pele foram cortadas e trituradas em Ultra-Turrax[®] T25 digital em solução tampão fosfato contendo EDTA e inibidores de protease, e em seguida centrifugadas a 18.514 g por 10 min a 4°C em centrífuga Eppendorf (modelo 5810R). O sobrenadante foi coletado, e a interleucina TNF α foi quantificada por imunoenensaio ELISA em kit específico para citocinas de camundongos, conforme instruções do fabricante. A quantificação de proteína das

amostras foi executada através da técnica de Bradford. Os resultados foram expressos em picograma de TNF α por cada miligrama de pele.

3.2.10.4. Análises histológicas por coloração hematoxilina-eosina (H&E)

Fragmentos da pele dorsal dos camundongos foram removidos e fixados em solução de formol 10% em tampão fosfato 0,1 M. Após 24 horas, as amostras foram submetidas a sessões de desidratação em álcool 80%, 90%, 95% e álcool absoluto (100%) 1, 2 e 3, seguidas de xilol (I e II), e então incluídas em parafina Histosec[®]. Espécimes de 5 μ m foram obtidos com o auxílio de micrótomo rotativo manual e, depois, montados em lâminas. A seguir, as lâminas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e montadas para visualização sob microscopia óptica de luz convencional. Foram realizadas leituras na objetiva de 10X e 20X abordando todas as camadas da pele – estrato córneo, epiderme e derme –, com análise da espessura da epiderme e infiltração de células inflamatórias na derme.

3.2.11. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad Prism[®] (versão 5.01, Califórnia, EUA), e os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão. A diferença entre os grupos foi determinada pela análise de variância ANOVA de uma via, seguida do teste de Turkey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificar o composto TPPS2a

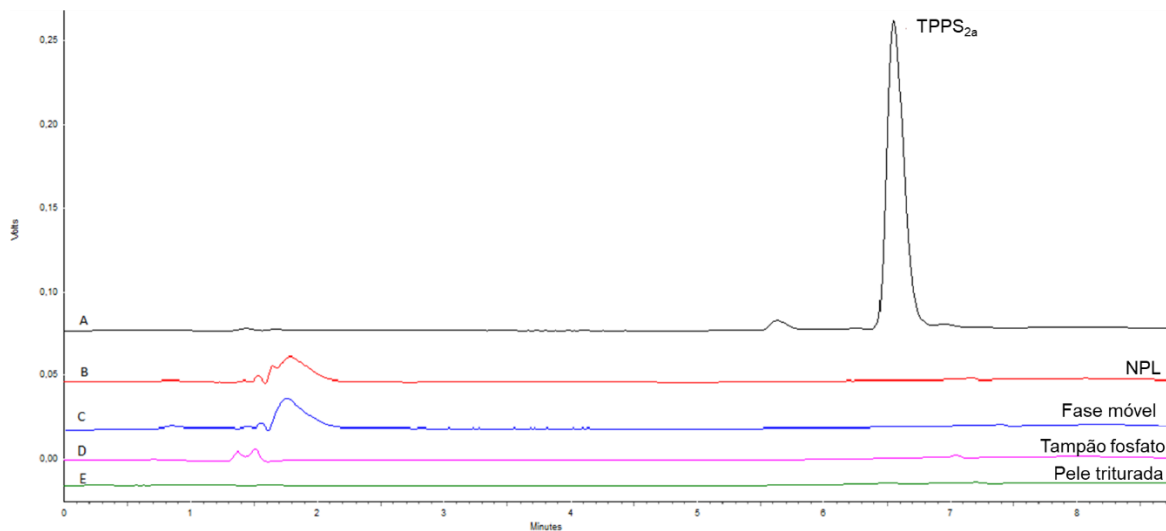
Foi desenvolvido e validado um método por CLAE que pudesse quantificar o TPPS2a nas diferentes etapas experimentais, como no estudo da eficiência de encapsulamento e no ensaio de permeação cutânea *in vitro*. Toda a validação do método desenvolvido nessa pesquisa foi realizada de acordo com a RDC nº 166, que estabelece os critérios para a validação de métodos analíticos, quais sejam: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

O método desenvolvido nessa pesquisa baseou-se na estrutura química do TPP2a e em compostos de estrutura semelhante (da família das porfirinas), que já possuem métodos analíticos em CLAE publicados (LILLETVEDT *et al.*, 2011). O método foi definido com fase móvel em gradiente, devido a testes previamente realizados no laboratório, onde a concentração de metanol é aumentada e posteriormente diminuída conforme o tempo de corrida (10 minutos). A fase móvel foi composta de metanol e água com 0,5% de trietilamina, que foi adicionada à água para melhorar a simetria do sinal cromatográfico do composto TPPS2a, bem como para facilitar a passagem do FS pela coluna, pois ela compete pelos grupos silanóis (Si-OH) que estão presentes na coluna, e assim o FS não interage fortemente com esses grupamentos, passando mais facilmente. O fluxo foi definido em 0,8 mL/min, e o comprimento de onda de detecção do TPPS2a, em 420 nm (LILLETVEDT *et al.*, 2011). O volume de injeção das amostras (analito) foi de 20 µL, e a temperatura regulada para 40°C. O TPPS2a é um pó de cor escura que foi inicialmente dissolvido em 0,5 mL de DMSO e deixado em sonificador de banho por 5 minutos, seguido de diluição em tampão PBS (MA *et al.*, 2017) até a concentração de 2 mg/mL (solução estoque).

A seletividade é definida como a capacidade de identificar ou quantificar o composto de interesse, mesmo na presença de componentes que possam estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (RDC nº 166/2017). Por isso, para a seletividade do método foram testados possíveis interferentes que poderiam influenciar a quantificação do TPPS2a. Nesse ensaio foram testadas: a formulação NPL; a fase móvel (com 40% de metanol); o tampão

fosfato 30 mM (tampão utilizado no teste de permeação cutânea); e a pele de suíno triturada. O padrão que foi testado juntamente com as demais amostras foi o da concentração de 1,25 µg/mL de TPPS2a. Os resultados mostraram que nenhum dos interferentes estudados influenciou a quantificação e detecção do FS, pois nenhum deles apresentou pico de detecção perto do comprimento de onda de 420 nm, sendo esse pico representado apenas pela presença do FS.

Figura 11 – Gráfico da seletividade do composto TPPS2a frente os interferentes



Fonte: elaborada pela autora.

Para verificar a linearidade do método, foram feitas 5 concentrações diferentes do TPPS2a: 5; 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 µg/mL. Através dos resultados, foi feito o gráfico dos pontos (cada concentração) e calculada a equação da reta. Para um método ser considerado linear, ele deve apresentar um $r^2 \geq 0,99$ (RDC nº 166/2017), e o r^2 calculado apresentou o valor de 0,998 (Tabela 3), verificando a linearidade do método.

Tabela 3 – Valores dos parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação

Parâmetros	TPPS2a
Concentrações (µg/mL)	0,15 - 5
Equação linear	$y = 10^6x + 112939$
r^2	0,998
R	0,999
Limite de detecção (µg/mL)	0,08
Limite de quantificação (µg/mL)	0,15

Fonte: elaborada pela autora.

Os limites de detecção (LD) – menor quantidade do composto presente na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada – e de quantificação (LQ) – menor quantidade do composto na amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis – foram determinados. O LD é uma técnica visual por meio da qual é possível constatar o efeito visual esperado do sinal cromatográfico do analito (RDC nº 166/2017). O LD do método foi de 0,08 µg/mL (Tabela 3), obtido experimentalmente, e essa concentração detectada deve ficar ao menos três vezes acima da linha de base do cromatograma. Representa a menor concentração feita nas corridas cromatográficas (triplicata), nas quais nenhuma alteração visual foi observada (entre picos). Para determinação do LQ, foram feitas 13 leituras da menor concentração quantificada com precisão e exatidão, e o resultado foi de 0,15 µg/mL de TPPS2a (Tabela 3).

A precisão e exatidão foram determinadas em dias diferentes (interdia) e no mesmo dia (intradia). Foram realizadas corridas cromatográficas com 3 concentrações diferentes: uma alta (5 µg/mL); uma média (1,25 µg/mL); e uma baixa (0,3125 µg/mL), em triplicata. A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos (repetibilidade) por meio de ensaios com amostras preparadas de maneira independente desde o início do procedimento. De acordo com a RDC nº 166/2017, a precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula a seguir, onde DP corresponde ao desvio padrão, e CMD, à concentração média determinada, e não são admitidos valores superiores a 5%:

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100$$

Os valores de precisão inter e intradia estão presentes na Tabela 4. A exatidão de um método analítico é obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em relação a um valor aceito como verdadeiro, e deve ser verificada a partir de, no mínimo, 3 concentrações: baixa, média e alta, fazendo triplicatas em cada nível. A exatidão pode ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito, calculada conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100$$

Quanto mais próximo do 100%, maior a exatidão do método, significando uma maior recuperação. Os valores inter e intradia de exatidão também se encontram na Tabela 4. Através da análise dos resultados, foi possível verificar que o método desenvolvido foi preciso e exato de acordo com os parâmetros testados.

Tabela 4 – Valores da precisão e exatidão do método desenvolvido para quantificar o TPPS2a

(n = 3)	5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,3125 µg/mL
Intraensaio			
Médias	5,36	1,33	0,29
Precisão (%)	3,18	1,51	0,67
Exatidão (%)	107,16	106,51	94,20
Interensaio			
1° Dia	4,86	1,33	0,35
2° Dia	5,36	1,33	0,29
3° Dia	4,80	1,34	0,36
Média	5,00	1,33	0,38
Precisão (%)	0,06	4,40	1,51
Exatidão (%)	100,12	106,53	107,95

Fonte: elaborada pela autora.

A robustez é um parâmetro realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Foram feitas 3 alterações: na temperatura, que foi aumentada para 42°C; no fluxo, que foi aumentado para 1 mL/min; e na fase móvel, que foi alterada na proporção de trietilamina, aumentando para 0,75%. Em cada uma das alterações, foi passada uma curva analítica com as 5 concentrações de uso, e com os resultados das áreas coletados no equipamento foi calculada a equação da reta e o r^2 , com o objetivo de verificar a linearidade do método. Os resultados demonstraram que nenhuma das alterações feitas afetou negativamente a linearidade do método. A variação de temperatura gerou um r^2 de 0,99; a mudança no fluxo no interior da coluna resultou em um r^2 de 0,99; e por fim, a proporção aumentada de trietilamina também resultou em um r^2 de 0,99. Com os estudos de validação realizados, foi possível validar o método desenvolvido como seletivo, linear, preciso, exato; determinar os LD e LQ; e determinar a sua robustez em 3 parâmetros alterados. Com isso, esse método foi utilizado para a avaliação da eficiência de encapsulamento do TPPS2a nas NPLs e também na sua quantificação no estudo de permeação cutânea em células de difusão de Franz utilizando pele suína.

4.2. Planejamento experimental e obtenção das nanopartículas híbridas polímero-lipídicas

Para o planejamento das formulações, foi utilizado *Quality by Design* (QbD), uma ferramenta que, além de otimizar o processo de formulação, garante a obtenção de qualidade com as especificações desejadas e predeterminadas (ZIDAN *et al.*, 2007), através da compreensão dos fatores e seus efeitos de interação por um conjunto desejado de experimentos. Com o uso do QbD, foi possível verificar processos interferentes na produção das formulações e selecionar quais deles seriam modificados.

O QbD é uma abordagem sistemática, baseada em risco, voltada para a qualidade final do produto, e tem seus objetivos predefinidos para garantir a qualidade do produto final (PATIL *et al.*, 2015). O objetivo principal do QbD é identificar e controlar parâmetros críticos que possam afetar a qualidade do produto (BASALIOUS *et al.*, 2011; MALTESEN *et al.*, 2008). Essa ferramenta foi considerada pela Food and

Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos como uma forma de melhorar o desenvolvimento farmacêutico por meio do *design* dos processos, desde a conceituação do produto até sua comercialização (YERLIKAYA *et al.*, 2013; PATIL *et al.*, 2015). Na área farmacêutica, o QbD requer uma compreensão completa do produto e do processo (PATWARDHAN *et al.*, 2014). A adaptação da metodologia QbD aumenta a robustez e a qualidade do produto, além de reduzir o desperdício geral produzido durante a fabricação e o processo de obtenção dos produtos (YU, 2008; THO; BAUER-BRANDL, 2011).

O planejamento experimental escolhido nessa pesquisa foi o de Box-Behnken. O Box-Behnken é um planejamento quadrático independente, rotativo ou quase rotativo (não contém fatorial embutido), no qual as combinações de tratamento estão nos pontos médios das bordas do espaço do processo e no centro (BOX; BEHNKEN, 1960). Esse tipo de planejamento requer menos execuções do que um planejamento de composição central, no caso de três ou quatro variáveis, além de ser um planejamento de apenas 3 níveis (-1, 0, 1), eficiente para modelar superfície de resposta de ordem 2 (AHAD *et al.*, 2013; AHAD *et al.*, 2014).

Foram escolhidos 3 processos, julgados importantes para a produção da formulação, e estes foram alterados em 3 níveis diferentes. Com o auxílio do *software* Minitab, foi possível gerar 15 formulações diferentes. Essas 15 formulações foram obtidas e caracterizadas em relação ao seu diâmetro, potencial zeta e Pdl. Os processos que sofreram variância (variáveis independentes descodificadas) foram: a quantidade de Poloxamer (0,5; 1 e 1,5%); a quantidade do polímero catiônico PAH (0,1; 0,25 e 0,5%); e o tempo de sonicação a quente (5; 10 e 15 minutos). Como determina o planejamento, isso foi feito em 3 níveis diferentes (Tabela 5).

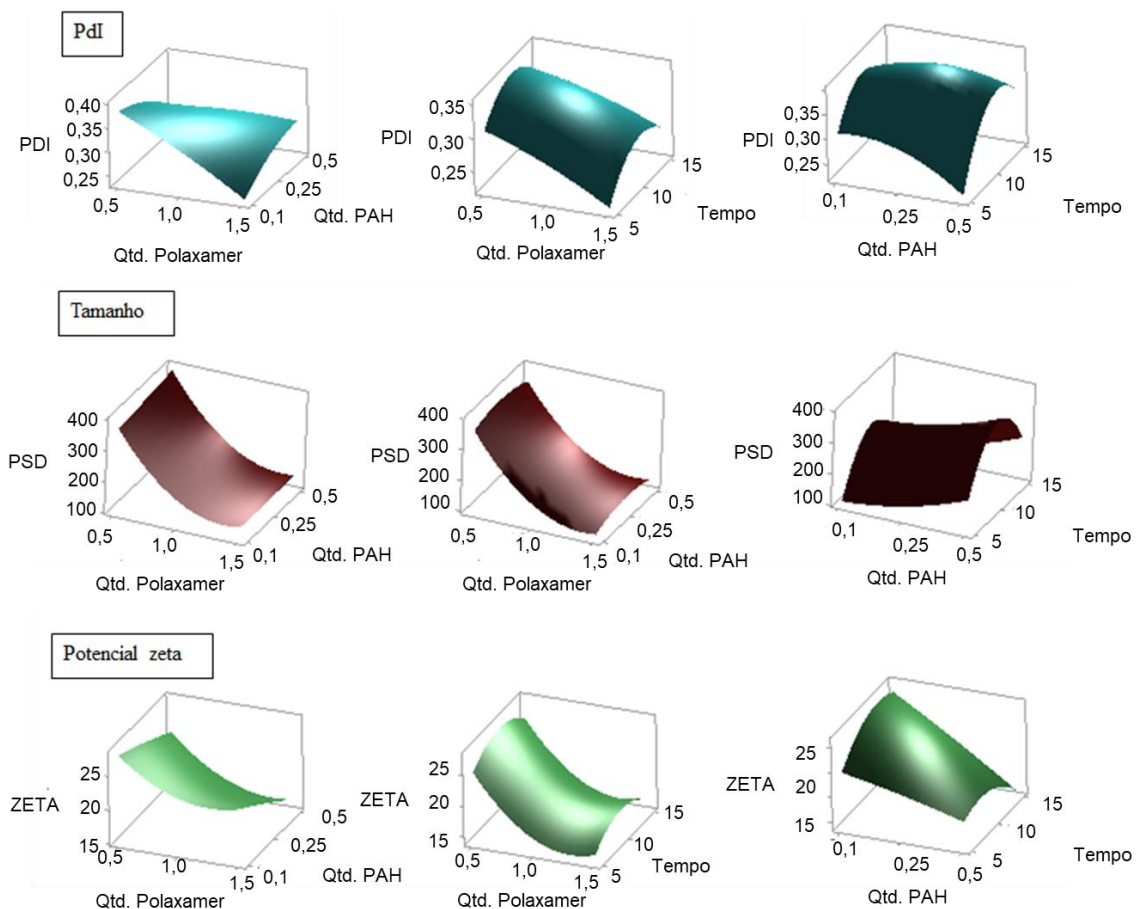
Tabela 5 – Formulações resultantes do planejamento Box-Behnken com os valores das variáveis independentes em seus níveis

Formulações	Quantidade de Poloxamer	Quantidade de PAH	Tempo de sonicação	Quantidade de Poloxamer	Quantidade de PAH	Tempo de sonicação
1	-1	-1	0	0,5	0,1	10
2	1	-1	0	1,5	0,1	10
3	-1	1	0	0,5	0,5	10
4	1	1	0	1,5	0,5	10
5	-1	0	-1	0,5	0,25	5
6	1	0	-1	1,5	0,25	5
7	-1	0	1	0,5	0,25	15
8	1	0	1	1,5	0,25	15
9	0	-1	-1	1	0,1	5
10	0	1	-1	1	0,5	5
11	0	-1	1	1	0,1	15
12	0	1	1	1	0,5	15
13	0	0	0	1	0,25	10
14	0	0	0	1	0,25	10
15	0	0	0	1	0,25	10

Fonte: elaborada pela autora.

Através do mesmo *software*, foi possível escolher os parâmetros de qualidade a serem priorizados na formulação final: maior potencial zeta (mais positivo) e menor Pdl. Após a obtenção das 15 formulações sugeridas pelo planejamento, os resultados foram acoplados ao *software*, que sugeriu uma formulação otimizada de acordo com os parâmetros escolhidos. Essa formulação resultante do planejamento continha 2% de Compritol® (componente já preestabelecido devido a estudos prévios), 1,5% de Poloxamer 188, 0,1% do polímero catiônico PAH, e 12 minutos de sonicação a quente (Figura 12).

Figura 12 - Imagem fornecida pelo *software* Minitab com os parâmetros de qualidade escolhidos (PDI, tamanho e potencial zeta) de acordo com a variância dos componentes que foram variáveis na formulação



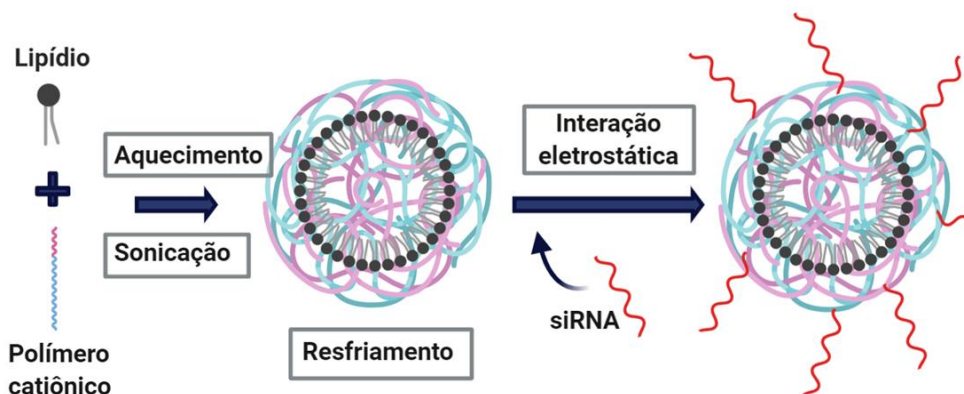
Fonte: elaborada pela autora.

A utilização dessa ferramenta otimizou o tempo e os materiais que seriam gastos na obtenção das nanopartículas híbridas. A formulação otimizada foi caracterizada quanto ao tamanho de partícula (DLS e NTA), carga superficial (potencial zeta), índice de polidispersão (PDI), concentração de partículas por volume (NTA), características calorimétricas dos componentes e formulação (DSC), e sua capacidade de complexação com siRNA. Além disso, foi feito o encapsulamento e eficiência de encapsulamento do TPPS2a nas NPLs, através da sua quantificação em CLAE.

A literatura descreve vários métodos para a síntese, sejam eles de uma ou duas etapas, e protocolos de preparação, como, por exemplo, extrusão e emulsificação de água/óleo de NPL, que podem influenciar significativamente as propriedades das nanopartículas, como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, eficiência de encapsulamento do fármaco ou ativo, e cinética de liberação. Em geral, os métodos

de duas etapas fornecem maior controle sobre essas propriedades em comparação com os métodos de uma etapa, porém, são mais demorados e trabalhosos (ZHANG *et al.*, 2017). A nanoprecipitação e ultrassonicação são utilizadas para a obtenção das NPLs. A complexação de polímero e fármaco catiônico ou aniônico pode ocorrer primeiro, para posteriormente juntar-se a matriz de lipídio sólido derretido. No caso de uso de siRNA aniônico, é possível fazer essa complexação depois da obtenção das NPLs, por interação eletrostática, como foi feito nesta pesquisa (Figura 13). O método utilizado para obtenção das NPLs foi o de homogeneização a quente, empregando um homogeneizador de alto cisalhamento (sonicador), com posterior resfriamento para completa formação das partículas.

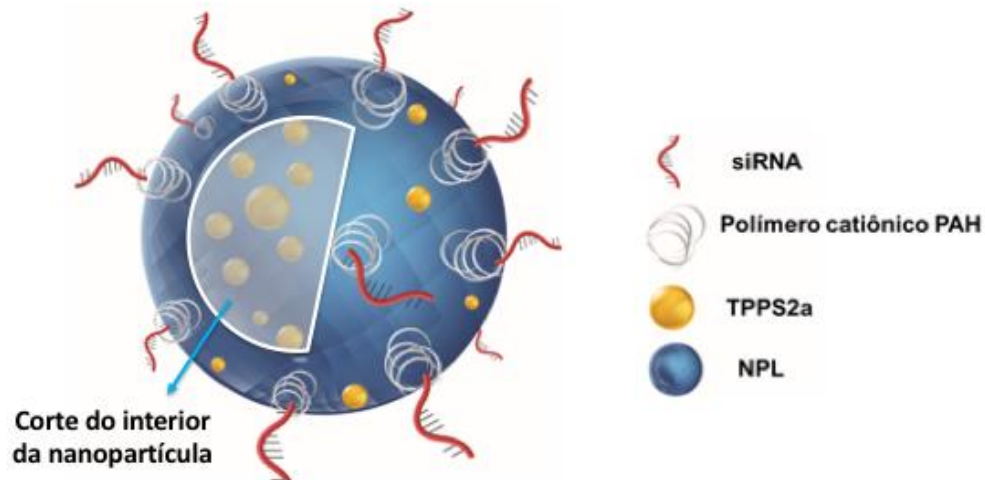
Figura 13 - Esquema representativo da obtenção das NPLs complexadas ao siRNA, que pode ser eletrostaticamente complexo com lipídios ou polímeros catiônicos



Fonte: elaborada pela autora.

Para a encapsulamento do TPPS2a, este, diluído em PBS, foi adicionado à fase aquosa juntamente com o Poloxamer e o polímero catiônico PAH, originando uma nova formulação, nominada de NPL-TPPS2a (Figura 14). A eficiência de encapsulamento foi realizada pelo método indireto, ou seja, após a centrifugação com ultrafiltração, o filtrado foi quantificado por CLAE. O resultado foi satisfatório (quase 100% de encapsulação), o que mostra que a formulação e a técnica de preparo foram adequadas.

Figura 14 – Ilustração do esquema de organização das nanopartículas da formulação NPL-TPPS2a-siRNA



Fonte: elaborada pela autora.

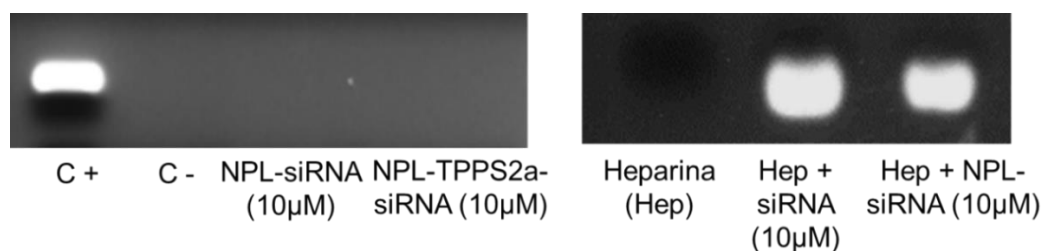
O propósito do TPPS2a encapsulado foi apenas otimizar o escape endossomal por meio da internalização fotoquímica do FS e da aplicação de luz, sem ocasionar a morte celular. De acordo com o princípio da internalização fotoquímica, as doses aplicadas de fotossensibilizador e luz são supostamente subdoses, levando principalmente a danos da membrana endossomal e lisossomal (BAGLO *et al.*, 2014). Na literatura, há registros de atividade fotoquímica do FS (TPPS2a) nas concentrações de 0,1 a 5 μM quando aplicados em cultura de células (MELLERT *et al.*, 2012; BAGLO *et al.*, 2014). Em um estudo envolvendo a internalização fotoquímica para aumentar o escape endossomal de fármacos anticancerígenos em culturas de células 2D e 3D, o tratamento das células foi feito com uma concentração de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ de TPPS2a, já diluído em meio de cultura (BAYONA *et al.*, 2017). Em outro estudo, os autores utilizaram o TPPS2a, na subdose de 0,4 $\mu\text{g/mL}$, para aprimorar o silenciamento do siRNA anti-EGFR por meio da otimização do escape endossomal por internalização fotoquímica (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Em função disso, neste estudo, a concentração inicial de TPPS2a na formulação foi 100 $\mu\text{g/mL}$, sabendo que essa concentração seria diluída muitas vezes para aplicação em cultura celular, ficando na faixa de subdose sugerida na literatura (entre 2,42 e 0,15 μM).

4.3. Eficiência de complexação e integridade do siRNA nas NPLs

Para que as NPLs possam veicular o siRNA para o interior das células-alvo, o siRNA precisa ser complexado ao seu carreador. A complexação foi realizada por meio da incubação da formulação desenvolvida de NPLs e o siRNA, para uma concentração final de 10 μM , durante 30 minutos. A complexação foi verificada em ensaio utilizando gel agarose de eletroforese. Como se pode observar na Figura 15, pela análise das amostras sem a presença de heparina, pode-se concluir que as NPLs foram capazes de complexar a concentração de siRNA utilizada. Quando há complexação, no caso das amostras NPL-siRNA e NPL-TPPS2a-siRNA, a banda representativa do siRNA (controle +) não é observada, pois o siRNA se encontra complexado à formulação, não migrando pelo gel, conseqüentemente, não se observa fluorescência.

Ao mesmo tempo que o siRNA precisa estar complexado na nanoestrutura para que não seja degradado no organismo e consiga efetivamente entrar nas células, para ser liberado no citoplasma e exercer seu efeito, é necessário que ele seja liberado da formulação. O ensaio de competição com heparina foi realizado para verificar se o sistema é capaz de liberar o siRNA, o que foi comprovado (Figura 15). Esse resultado é importante, pois indica que essa formulação tem potencial como sistema de liberação de siRNA.

Figura 15 - Determinação da complexação e estabilidade do complexo NPL-siRNA por eletroforese em gel de agarose 2%, 100 V, 20 minutos



Fonte: elaborada pela autora.

No controle positivo (C+) contendo siRNA livre, observou-se uma banda fluorescente detectada pelo Transluminator; no controle negativo (C-) contendo diluentes e nenhum siRNA, não houve banda fluorescente

4.4. Caracterização das NPLs e NPL-TPPS2a

Toda caracterização foi realizada com as formulações NPL e NPL-TPPS2a. Os resultados da caracterização por espalhamento de luz (DLS) do diâmetro médio, Pdl, carga superficial e eficiência de encapsulamento estão presentes na Tabela 6.

Tabela 6 – Diâmetro médio, Pdl, potencial zeta e eficiência de encapsulamento (EE) das formulações NPL e NPL-TPPS2a

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)	EE (%)
NPL	142,1 nm ± 3,6	0,277 ± 0,028	28,7 mV ± 3,2	---
NPL-TPPS2a	253,7 nm ± 5,8	0,340 ± 0,015	26,4 mV ± 2,7	99,51 ± 0,35

Fonte: elaborada pela autora.

O método de obtenção das NPLs produziu partículas com tamanho médio em torno de 142 nm, e para as NPL-TPPS2a, em torno de 253 nm. Ambas apresentaram índice de polidispersão igual a 0,3 ($Pdl \leq 0,3$), indicativo de sistemas com baixa polidispersão, o que foi considerado bom (valores abaixo de 1), sabendo que as nanopartículas são de matriz lipídica com rede polimérica. As duas formulações também apresentaram partículas com um residual de carga positiva, o que foi um dos parâmetros de qualidade escolhidos e requisitados no planejamento experimental, para que houvesse interação eletrostática entre as nanopartículas e o siRNA (aniônico). Além disso, uma carga residual positiva é interessante para a interação com as membranas celulares (GÜNTHER *et al.*, 2011).

Para uma caracterização mais detalhada do tamanho de partícula e da concentração de partículas por volume de formulação, as amostras foram diluídas 30.000 vezes para a análise do rastreamento (NTA). Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Tamanho e concentração de partículas das formulações NPL e NPL-TPPS2a resultantes da análise por NTA

Formulação	Tamanho (nm)	Concentração de partícula (partículas/mL)
NPL	150,8 ± 43	1,65 x 10 ¹³
NPL-TPPS2a	158,1 ± 51	2,35 x 10 ¹³

Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados obtidos do NTA mostraram alta concentração de partículas por volume de formulação, com tamanho de diâmetro semelhante aos resultados obtidos por DLS, ficando na faixa de 150 a 158 nm para NPL e NPL-TPPS2a, respectivamente. Verificou-se que o encapsulamento do TPPS2a levou a uma formulação com partículas de maior diâmetro e com maior concentração de partícula por volume.

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é utilizada para medir a diferença de energia entre uma amostra e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento sob atmosfera controlada. Geralmente é utilizada para determinar a temperatura de fusão e cristalização, entalpias de fusão e de cristalização, determinação da temperatura de transição vítrea (SAADI *et al.*, 2012).

Essa técnica é importante para a caracterização de nanopartículas lipídicas, pois fornece informações sobre o grau de cristalinidade, a temperatura e a entalpia (ΔH) de fusão das partículas. O grau de cristalinidade pode influenciar na eficiência de encapsulamento, na velocidade de liberação e de expulsão do ativo durante o processo de estocagem (MARCATO, 2009). Os eventos térmicos que geram modificações em curvas de DSC podem ser transições de primeira e de segunda ordem. As transições de primeira ordem apresentam variações de entalpia, que pode ser endotérmica (variações positivas, $\Delta H > 0$) ou exotérmica (variações negativas, $\Delta H < 0$), e dão origem à formação de picos (SAADI *et al.*, 2012). Uma alta entalpia sugere alta organização no retículo cristalino, pois a energia para superar as forças de coesão do retículo cristalino e, assim, garantir a fusão de um cristal organizado (perfeito) é maior do que a de um cristal pouco ordenado (MARCATO, 2009).

A análise de DSC foi realizada com os componentes da formulação, com o fotossensibilizador TPPS2a, com as NPLs e com as NPL-TPPS2a. As informações dos componentes das NPLs estão presentes na Tabela 8. Por causa do valor positivo das entalpias, todas as análises foram consideradas eventos endotérmicos ($\Delta H > 0$).

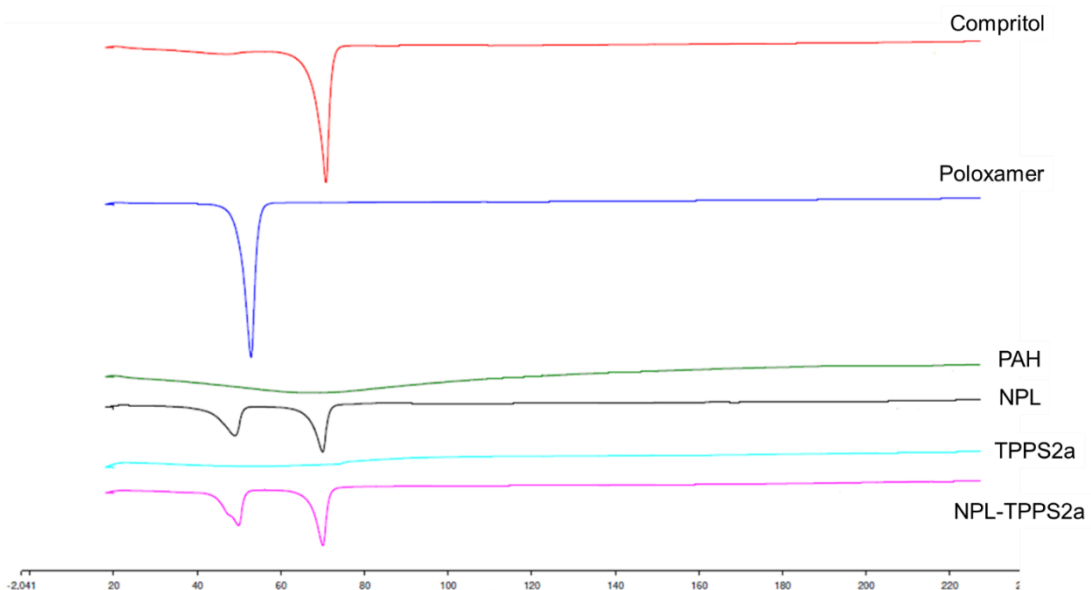
Tabela 8 – Pontos de fusão, entalpia e índice de recristalização dos componentes isolados das formulações, do fotossensibilizador, da mistura física, das NPLS e das NPL-TPPS2a

Amostra	Ponto de fusão (°C)	Entalpia (J/g)	Índice de recristalização do lipídeo (%)
Compritol	70,80	115,27	100
Poloxamer	52,89	125,90	---
TPPS2a	---	---	---
Mistura física	70,22	44,06	19,11
NPL	70,02	57,13	24,78
NPL-TPPS2a	70,05	58,57	25,41

Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados mostraram uma queda da entalpia tanto na mistura física, quanto nas NPLs e NPL-TPPS2, uma menor entalpia sugere cristais pouco ordenados, indicando que o retículo cristalino dessas formulações está menos organizado do que o retículo cristalino do lipídeo (Tabela 8). A presença do Poloxamer distribuído na fase lipídica derretida pode interferir na cristalização dos lipídios, resultando em uma entalpia menor. Além disso, os dois picos característicos do Compritol e do Poloxamer foram vistos nas formulações NPL e NPL-TPPS2a, indicando a presença de ambos na formulação (Figura 16).

Figura 16 - Picos resultantes obtidos por DSC dos referentes componentes: Compritol, Poloxamer, PAH, das NPLs, do TPPS2a e das NPL-TPPS2a no intervalo de aquecimento de 20 a 230°C



Fonte: elaborada pela autora.

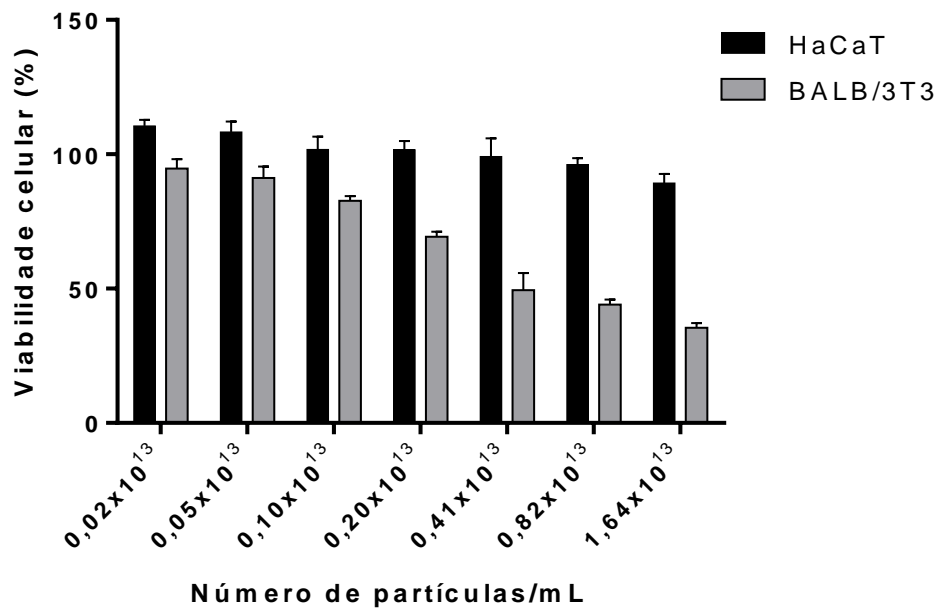
Autores verificaram o mesmo comportamento de diminuição do valor de entalpia em nanocarregadores lipídicos em relação aos lipídios livres utilizados. Geralmente, a presença de moléculas na matriz lipídica (como fármacos, polímeros) também influencia o grau de cristalização dos lipídios, pois acaba diminuindo a organização da camada lipídica, alterando, assim, a entalpia e o índice de recristalização, que está diretamente correlacionado à entalpia (GOMES *et al.*, 2014). Com os lipídios em menor organização, é possível sugerir uma maior possibilidade de encapsulamento do princípio ativo, pois os cristais encontram-se desorganizados (GOMES *et al.*, 2014). Assim, com essa desorganização na matriz lipídica, a interação com o TPPS2a pode ocorrer mais facilmente.

4.5. Avaliação da viabilidade celular

Para iniciar os estudos envolvendo cultura celular, foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* das NPLs em diferentes linhagens como forma de prever a toxicidade de diversos compostos (BORGHETTI-CARDOSO *et al.*, 2015), bem como determinar a concentração de NPLs que poderia ser usada nos experimentos com células. Foram utilizadas duas linhagens celulares diferentes, constituintes da pele: a linhagem HaCaT, queratinócito de pele humana, e a linhagem BALB/3T3, fibroblasto de camundongo. Primeiramente, a formulação NPL foi testada em diluição seriada (1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600 e 1:3200), para que fosse determinada a melhor concentração para o tratamento, em que não houvesse excesso de morte celular, ou seja, uma viabilidade celular maior que 80%.

Esse estudo foi revelado pelo método de redução da resazurina, que é um indicador que permite quantificar a viabilidade celular, pois as células viáveis conseguem converter o reagente originando um produto (resorufin) de coloração rosa fluorescente, e a fluorescência gerada em cada poço é lida em um leitor de placa (AHMED *et al.*, 1994). O tratamento foi realizado no intervalo de tempo de 4 horas (Figura 17). Os resultados foram expressos em relação ao número de partícula por volume de amostra, referentes a diluição seriada realizada em meio de cultura.

Figura 17 - Viabilidade celular das células HaCaT e BALB/3T3 tratadas com a formulação NPL em um tempo de incubação de 4 horas



Fonte: elaborada pela autora.

Este estudo permitiu observar que houve uma diferença entre as duas linhagens celulares, sendo uma mais sensível que a outra, em relação ao tratamento. A linhagem HaCaT se mostrou mais resistente que a linhagem BALB/3T3, pois sua viabilidade celular foi superior a 75% desde a primeira diluição (tratamento com maior concentração de partículas no meio). Essa citotoxicidade observada na linhagem BALB/3T3 pode se dever à uma maior concentração de PAH nas primeiras diluições, pois componentes poliméricos catiônicos podem apresentar certa toxicidade celular quando se encontram em altas concentrações no meio de cultura (LIU *et al.*, 2011). Comparando as duas linhagens em relação ao tratamento com as NPLs, as células HaCaT permaneceram 90% viáveis mesmo na menor diluição (1:50) correspondente a maior concentração de partículas no volume usado ($1,64 \times 10^{13}$ partículas/mL), ao contrário das células BALB/3T3, que tiveram sua viabilidade entre 70 e 80% a partir das concentrações $0,2 \times 10^{13}$ partículas/mL (correspondente a diluição 1:400) e $0,1 \times 10^{13}$ partículas/mL (correspondente a diluição 1:800), respectivamente.

Além da formulação com NPLs, também foram testadas em ambas as linhagens celulares, HaCaT e BALB/3T3, as formulações NPL-TPPS2a, NPL-TPPS2a-siRNA (com siRNA controle) e uma solução aquosa de TPPS2a, tanto na ausência quanto na presença de irradiação. O tratamento com a formulação contendo

siRNA não específico foi feito para garantir que o siRNA não fosse tóxico na concentração utilizada. Após a eficiência de encapsulamento do TPPS2a ser verificada (Tabela 6), sua concentração final contida dentro das NPLs foi de aproximadamente 100 µg/mL. Nos resultados com essa formulação, as diluições seriadas feitas anteriormente foram substituídas por seu equivalente de TPPS2a (concentração em µM e µg/mL) no meio de cultura, logo, os resultados foram expressos em relação à concentração do TPPS2a existente (Tabela 9).

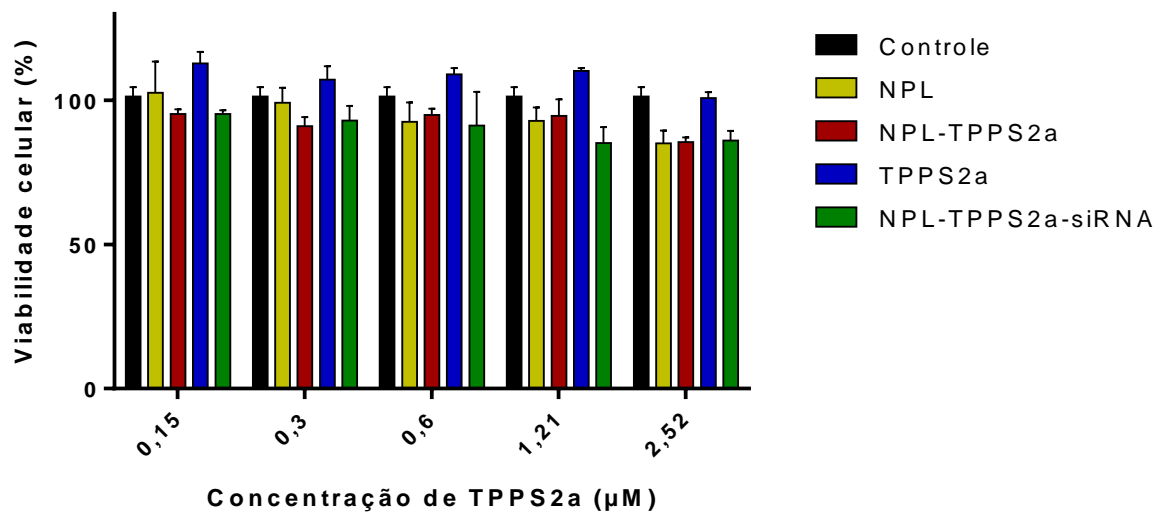
Tabela 9 – Diluições seriadas realizadas na cultura celular com o seu equivalente em concentração de TPPS2a

Diluição	Concentração de TPPS2a (µM)	Concentração de TPPS2a (µg/mL)
1:50	2,42	2
1:100	1,21	1
1:200	0,6	0,5
1:400	0,3	0,25
1:800	0,15	0,12

Fonte: elaborada pela autora.

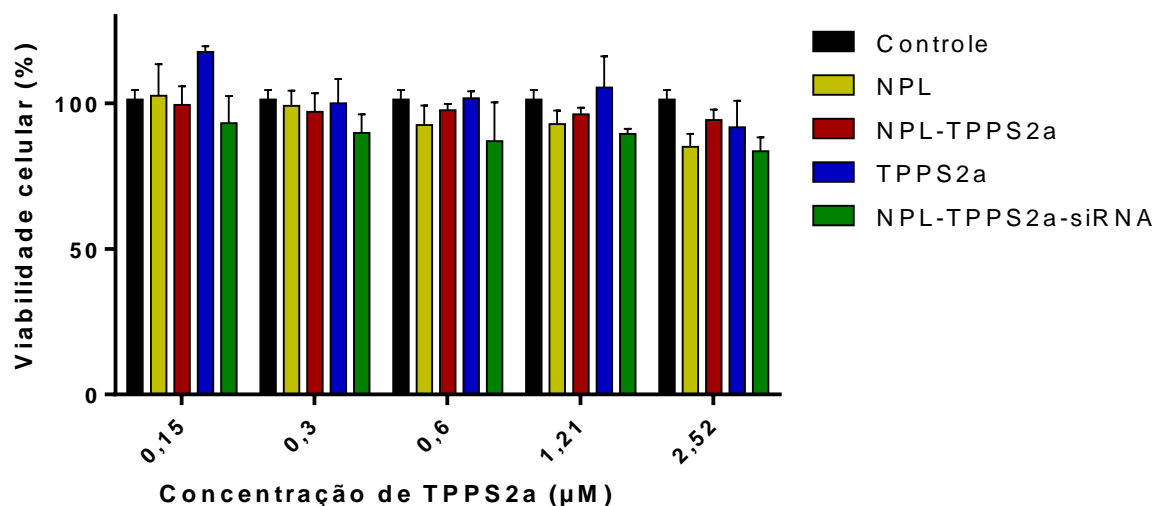
Nesses experimentos, além do tempo de incubação de 4 horas, foi testado o tempo de 18 horas, sugerido em estudos publicados envolvendo internalização fotoquímica de porfirinas em cultura de células como mecanismo de escape endossomal (BERSTAD *et al.*, 2015; BAGLO *et al.*, 2014; WEYERGANG *et al.*, 2011). Nas Figuras 18 a 21 estão os resultados de cada linhagem celular, com seus tratamentos na ausência de irradiação. Esses testes foram realizados para verificar a existência de alguma alteração na viabilidade celular com tratamento com o FS tanto na formulação quanto em sua forma livre em solução aquosa, pois o FS deve ser isento de citotoxicidade.

Figura 18 - Viabilidade celular da linhagem HaCaT com tratamento de: DMEM, NPL, NPL-TPPS2a, solução de TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA, na ausência de irradiação, durante 4 horas



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 19 - Viabilidade celular da linhagem HaCaT com tratamento de: DMEM, NPL, NPL-TPPS2a, solução de TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA, na ausência de irradiação, durante 18 horas

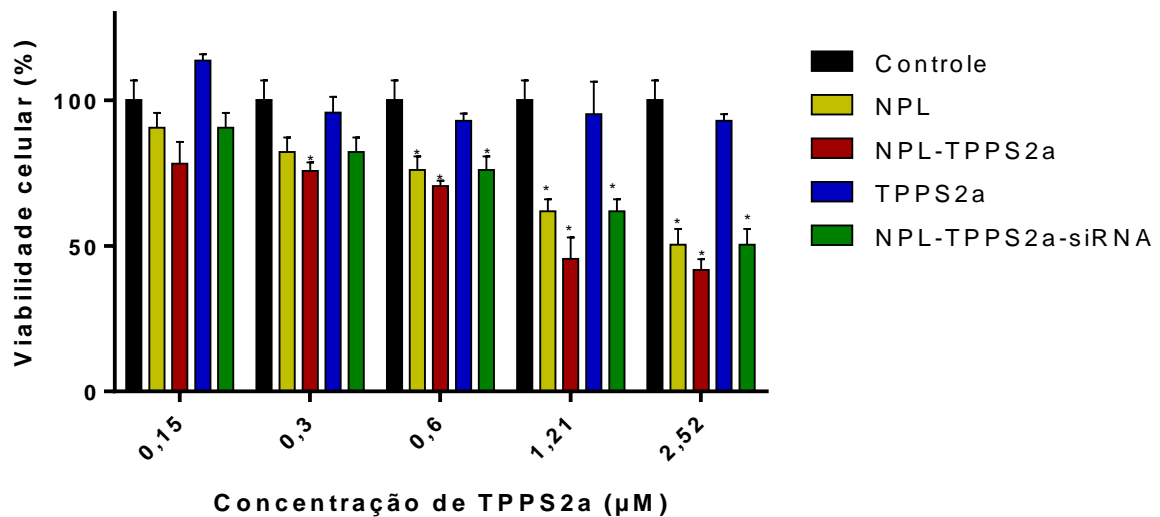


Fonte: elaborada pela autora.

Para a linhagem HaCaT, foi observado que os 4 tratamentos testados não ocasionaram mudanças na viabilidade das células (Figura 18 e 19), a qual permaneceu perto de 90-100% em todas as concentrações do experimento. Foi observado que o tempo de incubação de 18 horas não alterou a viabilidade celular dessa linhagem, apresentando comportamento celular semelhante ao tratamento de

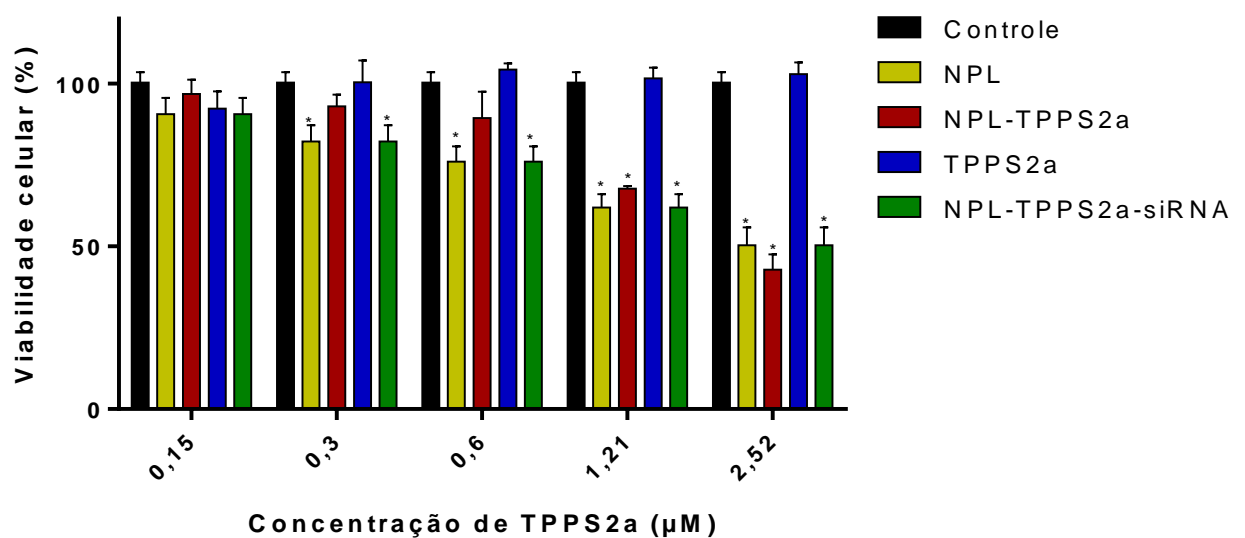
4 horas. O tratamento com siRNA controlado complexo às NPLs também não apresentou citotoxicidade nas células HaCaT.

Figura 20 - Viabilidade celular da linhagem BALB/3T3 com tratamento de: DMEM, NPL, NPL-TPPS2a, solução de TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA, na ausência de irradiação, durante 4 horas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TPPS2 controle



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 21 - Viabilidade celular da linhagem BALB/3T3 com tratamento de: DMEM, NPL, NPL-TPPS2a, solução de TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA, na ausência de irradiação, durante 18 horas. * $p < 0,05$ em relação ao grupo TPPS2 controle

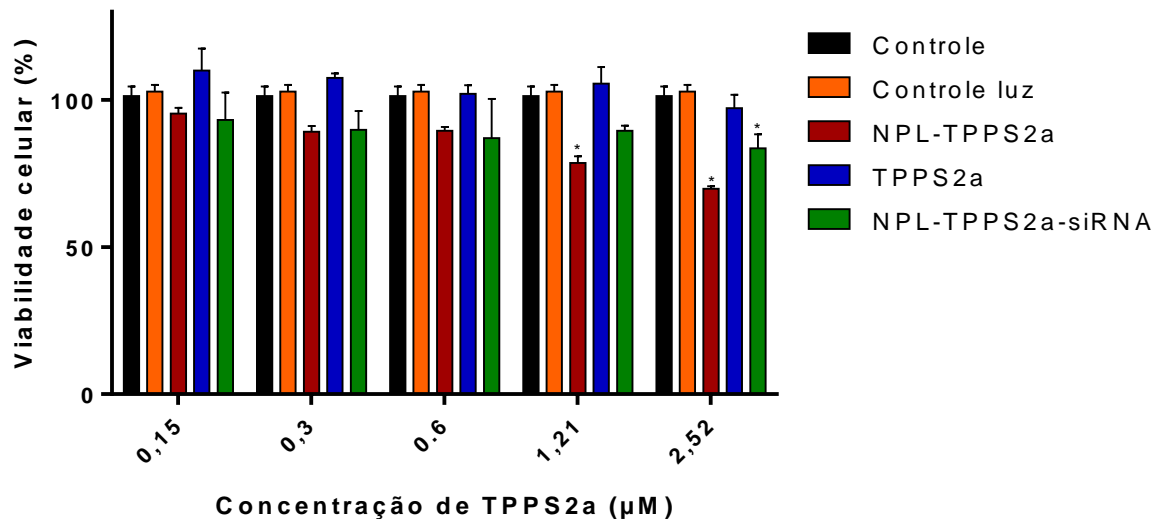


Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados na linhagem BALB/3T3 (Figura 20 e 21), assim como nas células HaCaT, demonstraram que, independentemente de um maior tempo de tratamento, o comportamento celular foi semelhante ao tratamento de 4 horas. Assim como no tratamento anterior de 4 horas, a viabilidade celular foi menor nas concentrações maiores (maior concentração de partículas = menor diluição), a viabilidade foi aumentando conforme a concentração de NPLs no meio foi diminuindo para os tratamentos com NPL, NPL-TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA. Diferentemente das formulações, os resultados do tratamento com solução contendo TPPS2a diluído não apresentaram toxicidade ou alteração na viabilidade das células mesmo na maior concentração do FS, inferindo-se que a citotoxicidade encontrada pode ser devido a maior concentração do polímero catiônico PAH (maior número de partícula por mL).

As condições de controle foram muito bem avaliadas a fim de garantir completo estudo sobre esse ensaio. Assim como a concentração do TPPS2a foi baseada em subdoses, o tratamento com irradiação também foi baseado em estudos prévios que utilizaram FS semelhantes ao dessa pesquisa, com o propósito de internalização fotoquímica (BERSTAD *et al.*, 2015; BAGLO *et al.*, 2014; WEYERGANG *et al.*, 2011). A subdose energética escolhida para trabalhar com ambas as linhagens foi de 0,81 J/cm². A presença e a ausência de irradiação foram controles importantes nesse experimento, pois, no processo de internalização fotoquímica, espera-se que não ocorra diminuição da viabilidade celular, pois, dessa forma, é garantido que nenhuma atividade fotodinâmica, que resulte em morte celular, está ocorrendo nas subdoses escolhidas para trabalho. Os tratamentos com irradiação foram feitos no intervalo de tempo de 4 horas, pois não foi observada diferença significativa entre os intervalos de 4 e 18 horas. Os resultados com a linhagem HaCaT estão presentes na Figura 22.

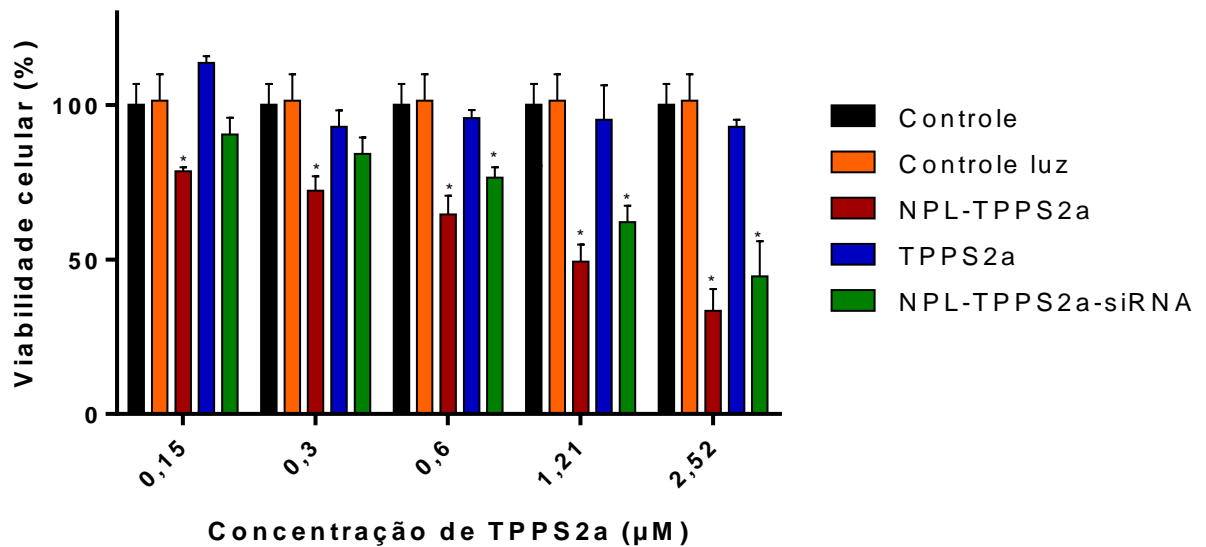
Figura 22 - Viabilidade celular da linhagem HaCaT com tratamento: DMEM, DMEM + 0,81 J/cm², NPL-TPPS2a + 0,81 J/cm², NPL-TPPS2a-siRNA + 0,81 J/cm², solução de TPPS2a + 0,81 J/cm², durante 4 horas. *p<0,05 em relação ao grupo controle



Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados das células HaCaT com irradiação, na intensidade de 0,81 J/cm², demonstraram que a formulação NPL-TPPS2a apresentou uma diminuição na viabilidade celular nas duas maiores concentrações (2,52 e 1,21 µM), quando comparada com o controle e com o tratamento NPL-TPPS2a na ausência de luz. Essa citotoxicidade foi diminuindo conforme a concentração de partículas no meio foi decrescendo, conseqüentemente, com menor concentração de TPPS2a no meio também. Foi observado que a subdose energética utilizada não alterou a viabilidade das células na situação de controle, assim como no tratamento com solução de TPPS2a, não ocorrendo morte celular devido a alguma atividade fotodinâmica, o que é desejável. Os resultados com a linhagem BALB/3T3 estão apresentados na Figuras 23.

Figura 23 - Viabilidade celular da linhagem BALB/3T3 com tratamento: DMEM, DMEM + 0,81 J/cm², NPL-TPPS2a + 0,81 J/cm², NPL-TPPS2a-siRNA + 0,81 J/cm², solução de TPPS2a + 0,81 J/cm², durante 4 horas. *p<0,05 em relação ao grupo controle



Fonte: elaborada pela autora.

Como nos tratamentos anteriores, a linhagem de células BALB/3T3 foi mais sensível aos tratamentos em relação à linhagem HaCaT, porém, diferentemente dos resultados encontrados para as células HaCaT, a linhagem BALB/3T3 não apresentou diferença nos resultados com o tratamento NPL-TPPS2a com irradiação na intensidade de 0,81 J/cm², quando comparado com o mesmo tratamento na ausência de irradiação. Como visto anteriormente, a viabilidade celular das células BALB/3T3 aumentou conforme a concentração de partículas no meio diminuiu, isto é, menos partículas por volume usado, e conseqüentemente, menor concentração de TPPS2a no meio.

Não foi observada influência da irradiação na viabilidade das células BALB/3T3 tratadas com solução de TPPS2a, assim como na das HaCaT, indicando que possivelmente nenhum efeito fotodinâmico da interação do FS com a luz resultou em morte celular. Também foi observado que a intensidade de irradiação utilizadas nos experimentos não alterou a viabilidade celular de ambas linhagens, uma vez que os resultados dos controles luz, tratados com DMEM com irradiação, foram semelhantes aos resultados dos controles (escuro), tratados apenas com DMEM. Com os experimentos finalizados, foi possível definir a concentração de NPLs que poderiam

ser administradas às células de modo a garantir uma viabilidade celular maior que 80% e, assim, seguir com os experimentos de internalização celular do siRNA.

4.6. Avaliação da captação celular do siRNA em células HaCaT e BALB/3T3 por citometria de fluxo e microscopia confocal

Para um silenciamento gênico eficiente mediado por administração exógena de siRNAs, é necessário que ocorra captação celular, tráfego intracelular, escape endossomal e liberação efetiva do siRNA de seu carreador (ALABI *et al.*, 2013). Estudos envolvendo o uso de siRNA livre (*naked* siRNA) têm mostrado que sua captação celular é ineficiente, resultando em baixas taxas de silenciamento gênico tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Isso ocorre devido às características físico-químicas do siRNA, como possuir alto peso molecular (~13 KDa) e carga negativa (BUMCROT *et al.*, 2006), por isso o siRNA não consegue atravessar a membrana citoplasmática por difusão passiva (LU; LANGER; CHEN, 2009).

Isso ressalta a importância de desenvolver um sistema de liberação que seja capaz de veicular o siRNA, além de complexá-lo e protegê-lo de enzimas, como também de promover sua captação nas células-alvo (KREBS; ALSBERG, 2011; DONG; SIEGWART; ANDERSON, 2019; VIEGAS *et al.*, 2020). Dessa forma, a captação (internalização) celular do siRNA em células foi determinada quantitativamente por citometria de fluxo, e qualitativamente por microscopia confocal.

O tempo de tratamento com as NPL-TPPS2a desse estudo foi de 4 horas, na linhagem HaCaT a diluição utilizada foi de 1:400 (correspondente a $0,2 \times 10^{13}$ partículas/mL), devido a sua viabilidade chegar a quase 100%; na linhagem BALB/3T3, a diluição foi de 1:800 (correspondente a $0,1 \times 10^{13}$ partículas/mL), com 80% das células viáveis, uma diluição maior devido a sua maior sensibilidade ao tratamento. Como controles foram feitos: tratamento com apenas DMEM (100% viável); tratamento com Lipofectamina (controle positivo), que possui alta capacidade de transfecção já conhecida; e tratamento com siRNA Alexa647 livre (sem carreador).

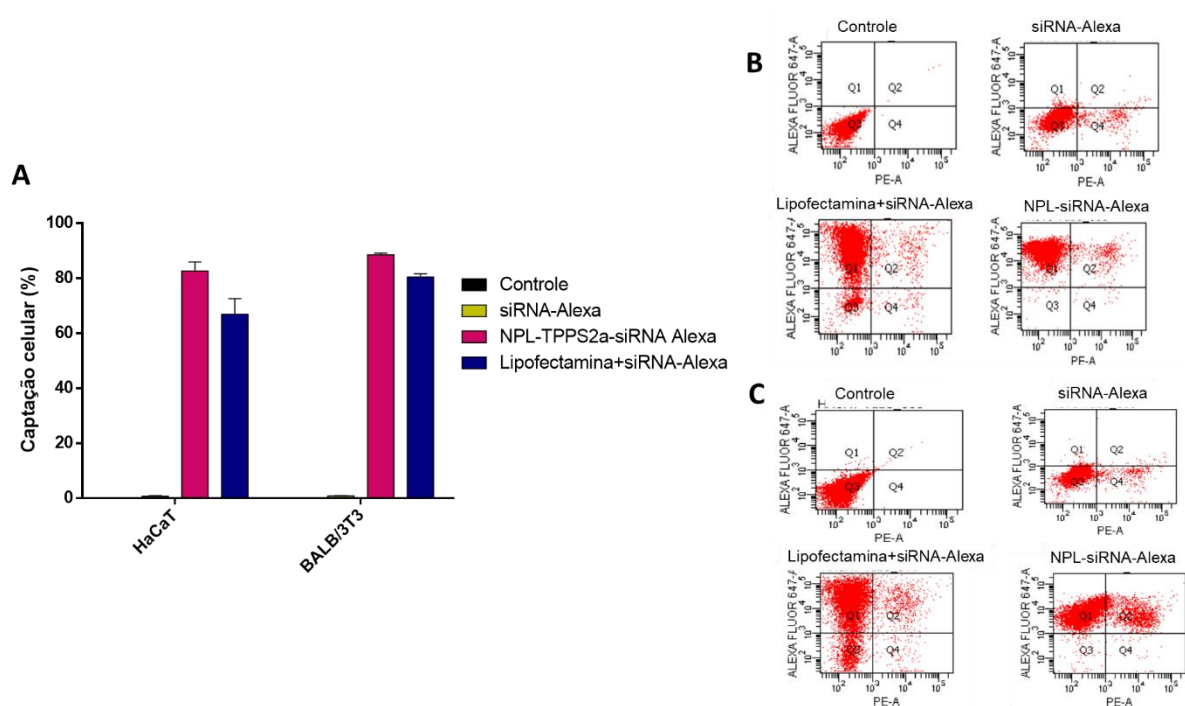
Os resultados das porcentagens de internalização presentes na Tabela 10 e na Figura 24 revelaram alta taxa de captação celular nos tratamentos com as NPLs, apresentando resultados superiores aos da Lipofectamina. Esse resultado mostra a vantagem do uso do nanocarreador, pois com alta internalização e captação celular, há maior chance de a entrega do siRNA ser efetiva.

Tabela 10 – Valores em porcentagem da internalização celular do siRNA Alexa647 livre, do controle positivo Lipofectamina, e do tratamento com as NPLs durante 4 horas

	siRNA-Alexa livre	Lipofectamina	NPL-TPPS2a
HaCaT	0,70%	86,20%	94,10% (1:400)
BALB/3T3	0,80%	85,60%	94,49% (1:800)

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 24 – A) Captação celular nas linhagens HaCaT e BALB/3T3. B) Dot plot representativo dos tratamentos em células BALB/3T3 determinado por citometria de fluxo. C) Dot plot representativo dos tratamentos em células HaCaT determinado por citometria de fluxo.

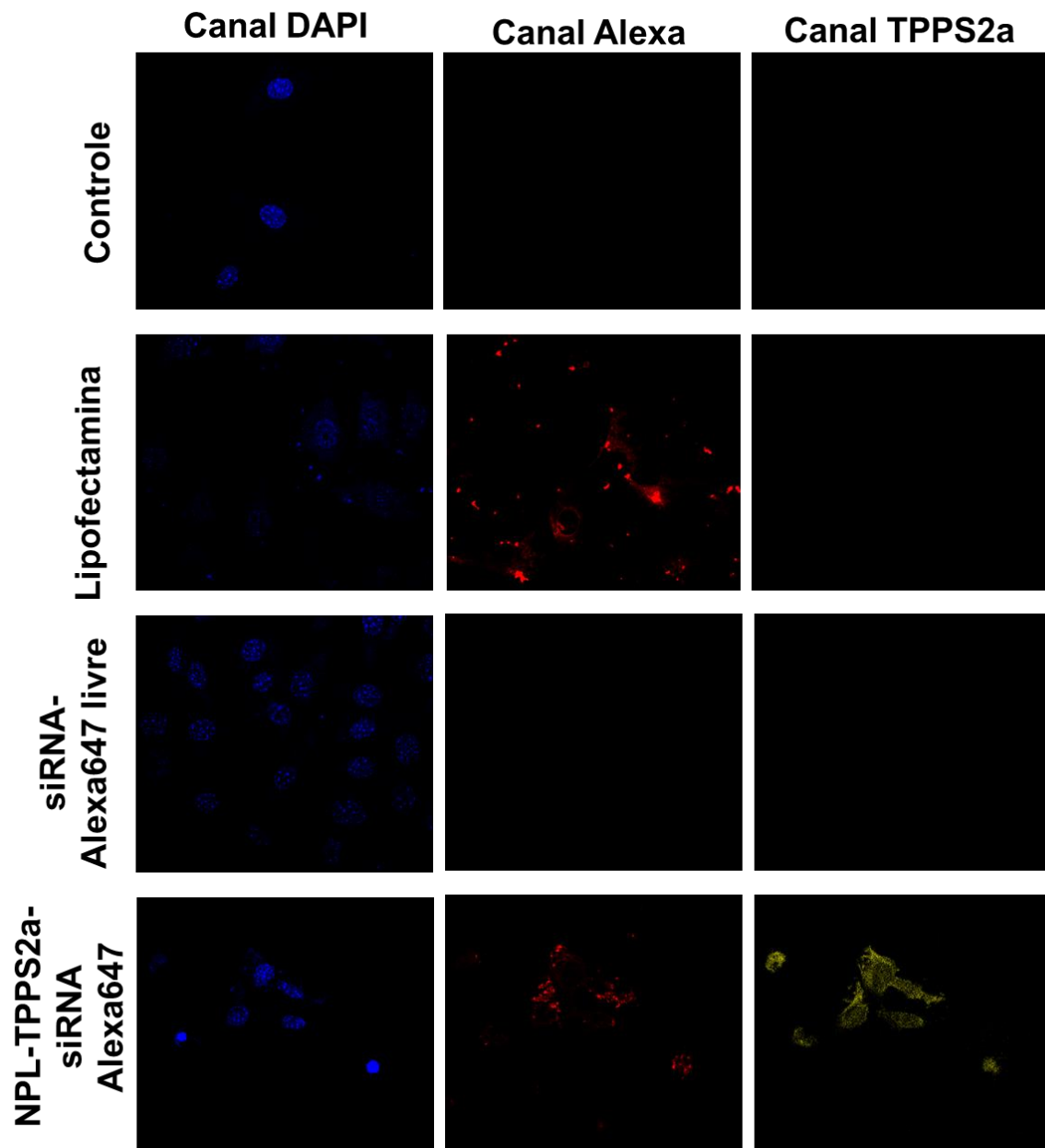


Fonte: elaborada pela autora.

A captação celular também foi confirmada em imagens de microscopia confocal em ambas as linhagens celulares, BALB/3T3 (Figuras 25 e 26) e HaCaT (Figuras 27 e 28). As células foram tratadas com DMEM (controle negativo), com Lipofectamina complexada ao siRNA Alexa647 (controle positivo), com o siRNA Alexa647 livre, com as NPL-siRNA Alexa647 e as NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 durante 4 horas. Os resultados obtidos pela microscopia confocal após 4 horas de tratamento corroboram os dados obtidos na citometria de fluxo. As imagens resultantes demonstraram a

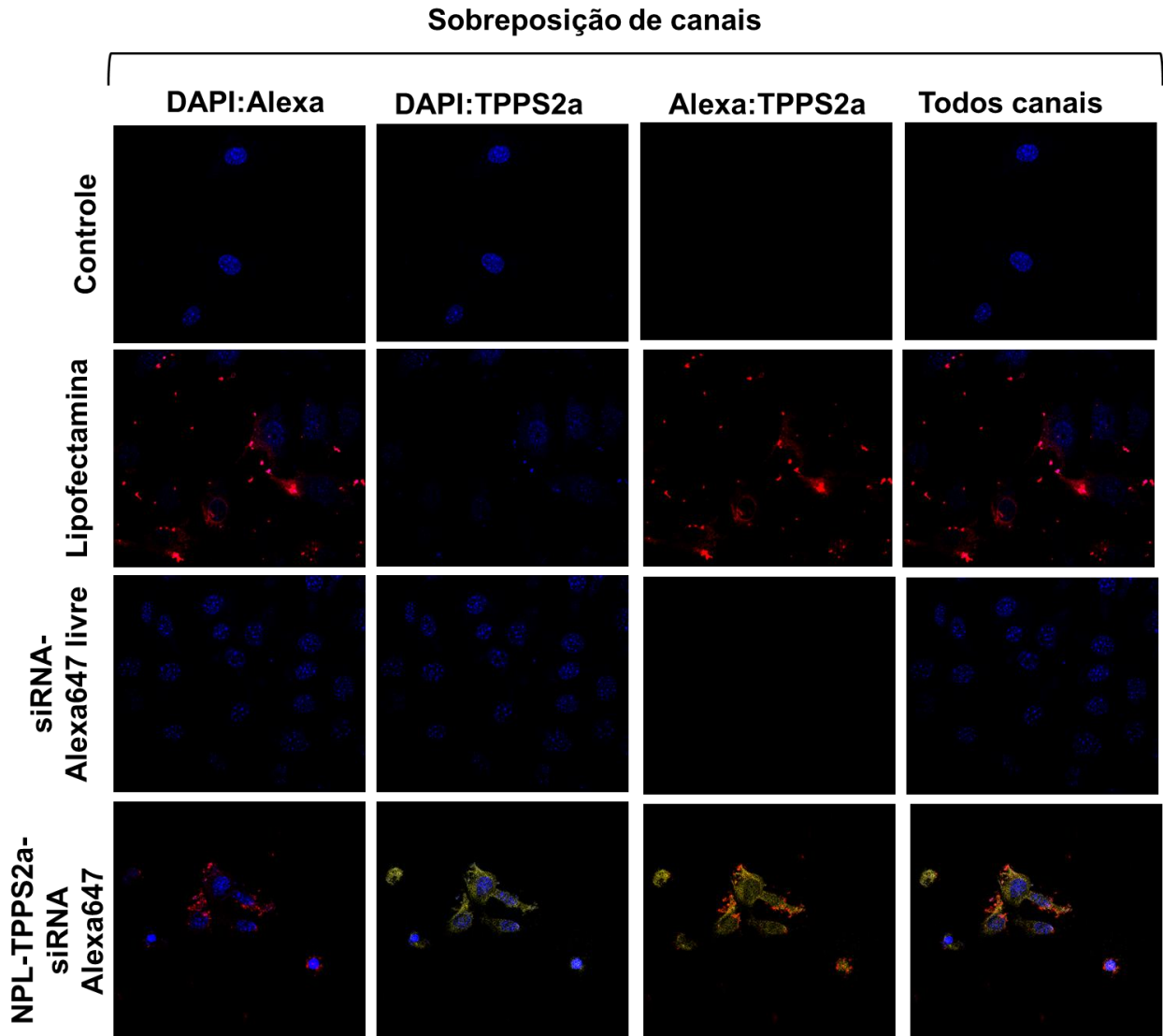
presença do siRNA Alexa647 (representado pela cor vermelha) no citoplasma celular das células tratadas com NPL-TPPS2a (TPPS2a representado pela cor amarela) e com a Lipofectamina, evidenciando que o siRNA conseguiu ser internalizado nessas condições.

Figura 25 - Imagens de microscopia confocal das células BALB/3T3 sem tratamento, tratadas com Lipofectamina (controle positivo), com siRNA Alexa647 em água livre de RNase, com NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 (concentração de 0,15 μ M), durante 4 horas



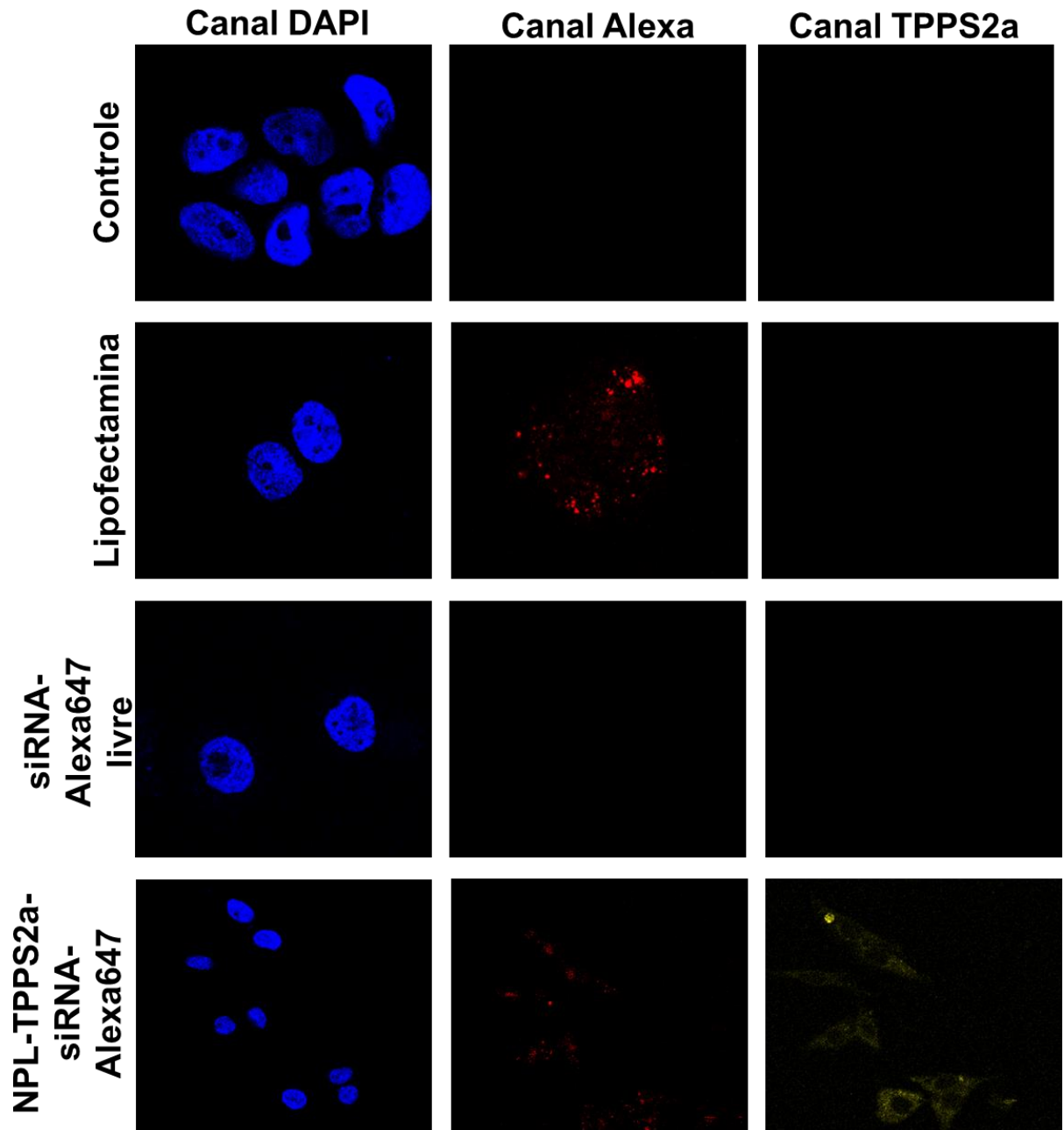
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 26 - Imagens de microscopia confocal com sobreposição dos canais das células BALB/3T3 sem tratamento, tratadas com lipofectamina (controle positivo), com siRNA Alexa647 em água livre de RNase, com NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 (concentração de 0,15 μ M de TPPS2a), tratamento de 4 horas



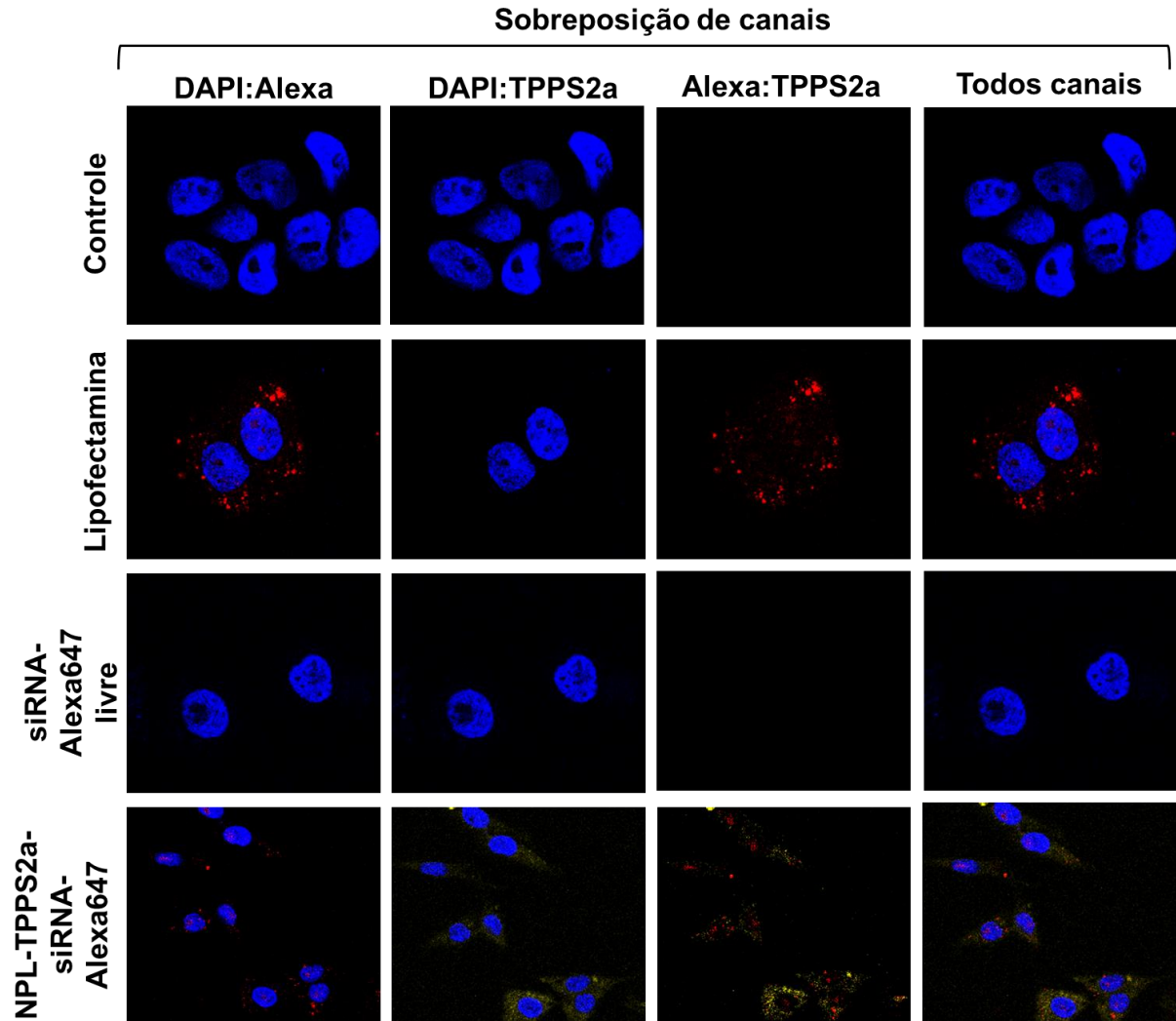
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 27 - Imagens de microscopia confocal das células HaCaT sem tratamento, tratadas com Lipofectamina (controle positivo), com siRNA Alexa647 em água livre de RNase, com NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 (concentração de 0,3 μ M de TPPS2a), tratamento de 4 horas



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 28 - Imagens de microscopia confocal com sobreposição dos canais das células HaCaT sem tratamento, tratadas com Lipofectamina (controle positivo), com siRNA Alexa647 em água livre de RNase, NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 (concentração de 0,3 μ M de TPPS2a), tratamento de 4 horas



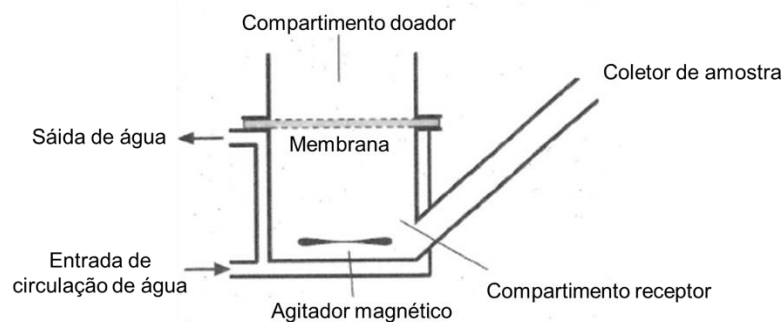
Fonte: elaborada pela autora.

Nos tratamentos com NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 foi possível notar a presença do TPPS2a no citoplasma celular, além da presença do siRNA Alexa647. Como mostram as imagens, o siRNA Alexa647 livre não foi capaz de ser internalizado pelas células de forma passiva, no entanto, quando veiculado por algum carreador, NPLs ou Lipofectamina, foi possível observar sua internalização celular. Esses resultados reforçam ainda mais a importância do uso de carreadores que possam veicular adequadamente o siRNA para o interior das células para que se tenha uma terapia eficaz.

4.7. Avaliação da retenção cutânea do siRNA-Alexa e permeação do TPPS2a veiculado pelas NPLs em modelo *in vitro* de pele suína

Para avaliar a retenção cutânea do siRNA, foi feito um ensaio *in vitro* utilizando um modelo de pele suína em células de difusão de Franz. Além da retenção do siRNA na pele, foi verificada a permeação do TPPS2a veiculado pela NLP-TPPS2a nesse modelo. Este estudo utilizou peles de orelha de suínos dermatomizadas colocadas corretamente nas células de difusão de Franz, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador, a 32°C (Figura 29). O estudo de permeação cutânea ocorre geralmente pela difusão por gradiente de concentração do composto de interesse, presente no compartimento doador, através da membrana, para a solução receptora no compartimento receptor, onde são coletadas amostras para determinação da concentração do composto permeado ao longo do tempo (ALLEN JR. *et al.*, 2007). A quantificação do TPPS2a permeado e retido na pele foi realizada pelo método analítico desenvolvido neste trabalho.

Figura 29 - Ilustração da célula de difusão de Franz



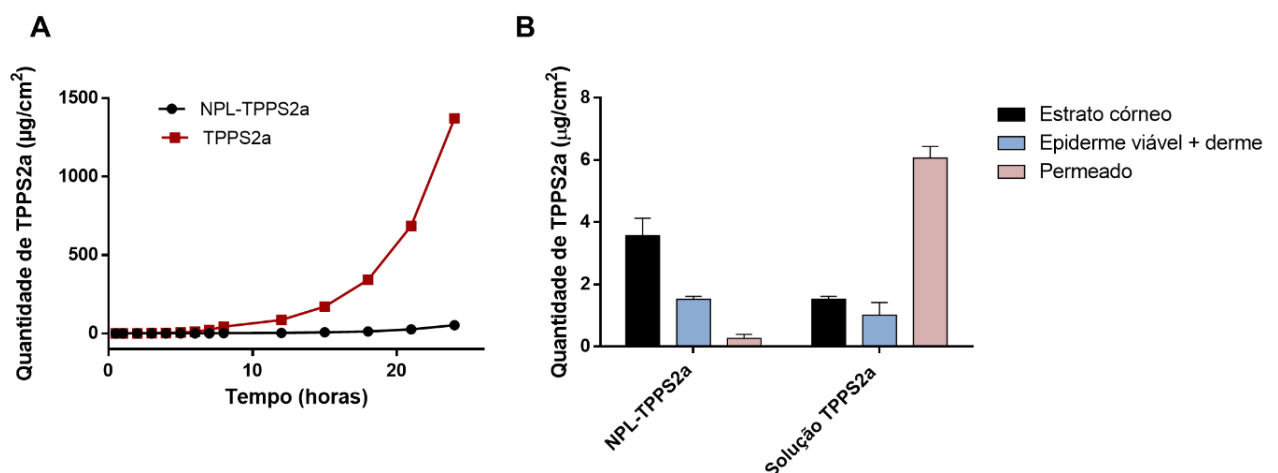
Fonte: adaptado de Ashrafi, 2020.

No ensaio de permeação cutânea, a formulação com NPL-TPPS2a e a solução aquosa de TPPS2a (100 µg/mL) foram colocadas no compartimento doador das células de difusão de Franz, e durante o intervalo de tempo de 24 horas foram coletadas amostras de 1 mL, gerando um total de 14 coletas (Figura 29A). Essas amostras foram filtradas e analisadas por CLAE, e o perfil de permeação do TPPS2a na pele de cada amostra foi determinado. Através da porção linear da curva, foi possível gerar uma equação da reta, onde o valor de a (inclinação da curva), corresponde ao valor do fluxo de permeação (J). Esse valor encontrado equivale à

taxa de passagem da substância através de uma unidade de superfície de área de pele, em função do tempo (HADGRAFT, 2001).

A Figura 30A mostra que, durante as 10 primeiras horas, ambas as amostras exibiram um perfil de permeação semelhante. Após esse tempo, é notável um aumento maior da quantidade permeada de TPPS2a quando em solução. O fluxo de permeação do TPPS2a encontrado para a formulação de NPL-TPPS2a foi de 0,022 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$, e para a solução aquosa de TPPS2a foi de 0,044 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$. Foi observado que o fluxo de permeação da NPL-TPPS2a foi metade do valor do fluxo da solução aquosa de TPPS2a, isto é, a taxa de passagem do TPPS2a através da superfície da pele em função do tempo na formulação com NPLs foi menor, significando que a NPL-TPPS2a demorou mais tempo para passar pela pele do que a solução de TPPS2a. Para uma formulação que possui como alvo principal a administração e ação tópica, como foi o caso nesta pesquisa, é importante que ela se mantenha retida nas camadas da pele, e não apenas passe, indo diretamente para a corrente sanguínea (derme). Esse comportamento otimiza a ação tópica, aumentando a segurança da formulação.

Figura 30 - Permeação e retenção cutâneas *in vitro* da formulação de NPL-TPPS2a e solução de TPPS2a



Fonte: elaborada pela autora.

A) Quantidade de TPPS2a permeada após 24 horas. B) Quantidades de TPPS2a retidas nas camadas da pele (estrato córneo e epiderme viável + derme) e permeada

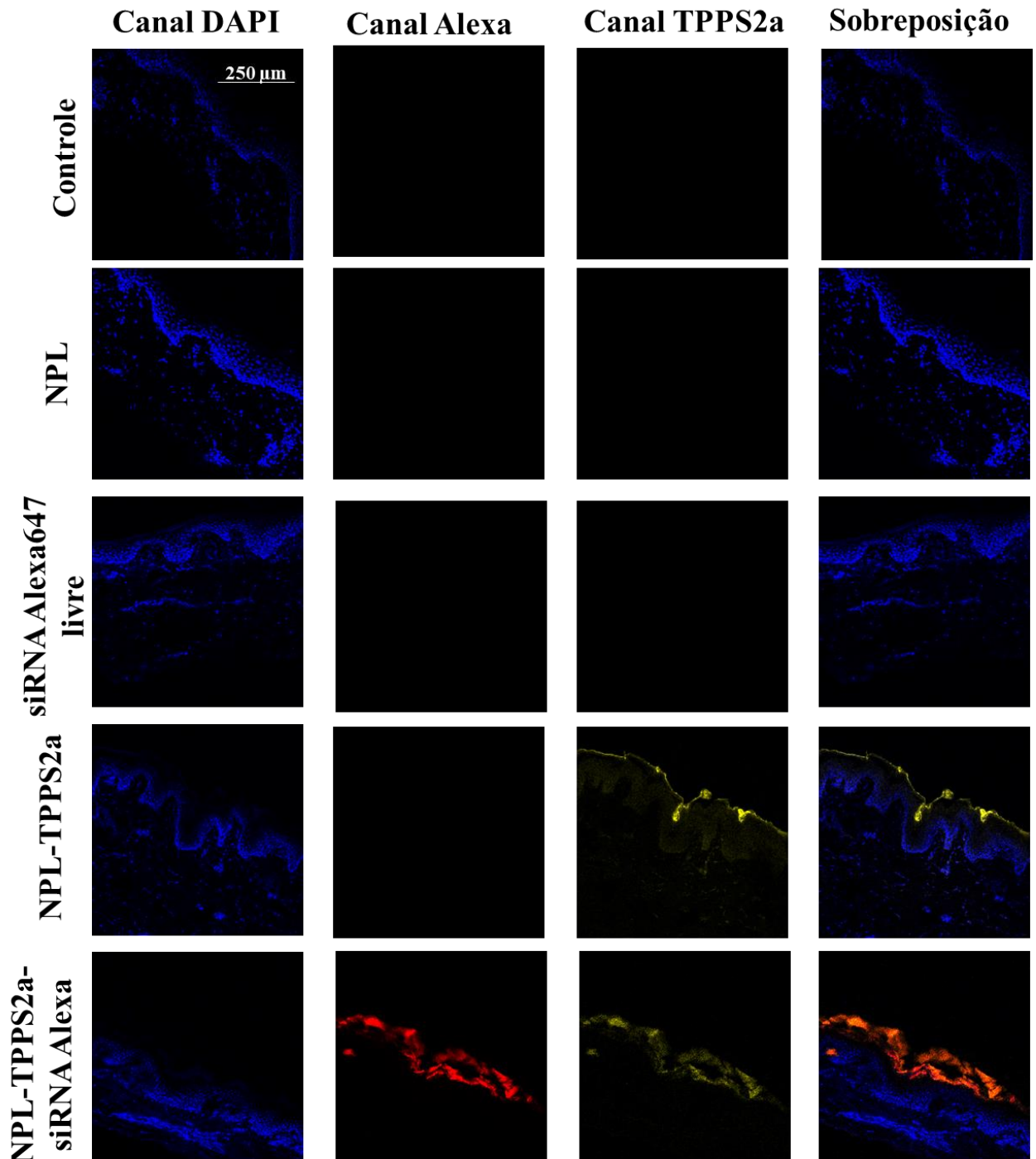
Além de quantificar o TPPS2a na porção permeada, o FS também foi quantificado nas camadas da pele, tanto no estrato córneo como na epiderme viável e derme (Figura 30B). O TPPS2a presente no estrato córneo, após as 24 horas de

tratamento, foi quantificado por meio de fitas adesivas (método *tape stripping*), que foram aderidas e retiradas cuidadosamente na pele (estrato córneo), e o conteúdo de TPPS2a analisado por CLAE, representando a quantidade retida no estrato córneo.

A epiderme viável e a derme remanescente foram submetidas à extração com metanol, e o conteúdo de TPPS2a quantificado por CLAE. O gráfico da Figura 30B mostra que a formulação NPL-TPPS2a apresentou maior retenção nas camadas da pele, estrato córneo e epiderme viável e derme. Como dito anteriormente, é de grande interesse que formulações com alvo no tratamento tópico fiquem retidas nas camadas da pele, e a NPL-TPPS2a foi bem-sucedida para essa finalidade, uma vez que o objetivo é que permaneçam na pele para tratar a inflamação causada pela psoríase.

A avaliação da retenção cutânea *in vitro* do siRNA foi realizada por microscopia confocal. Foram testadas cinco condições diferentes: PBS, NPL, siRNA Alexa647 livre, NPL-TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647. Esses tratamentos foram colocados nos compartimentos doadores das células de difusão de Franz e deixados por 24 horas. Após esse intervalo de tempo, coletaram-se as peles suínas e, a partir delas, lâminas foram montadas e coradas para análise por microscopia confocal (Figura 31).

Figura 31 - Imagens de microscopia confocal das peles suínas tratadas durante 24 horas em células de difusão de Franz, com os seguintes tratamentos: PBS (controle), NPL, siRNA Alexa647 livre, NPL-TPPS2a e NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647



Fonte: elaborada pela autora.

No tratamento com NPL-TPPS2a, além da coloração azul proveniente do DAPI (núcleo das células), foi observada a presença da cor amarela, proveniente do TPPS2a, no estrato córneo e na epiderme da pele, validando os resultados obtidos na

quantificação do TPPS2a por CLAE das camadas da pele. Nas imagens do tratamento com NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647, além das cores azul e amarela, foi notável a presença da cor vermelha proveniente do siRNA-Alexa647 no estrato córneo e na epiderme. As imagens com o tratamento com siRNA Alexa647 livre não apresentou coloração vermelha demonstrando que não houve penetração dessa molécula na pele, corroborando estudo anterior do grupo (VIEGAS *et al.*, 2020).

Outros trabalhos recentemente publicados, que utilizaram o modelo *in vitro* de pele de suínos, também comprovaram que o siRNA livre é incapaz de internalizar nas camadas da pele quando administrado de forma tópica. Os resultados desses estudos, tanto de imagens quanto quantitativos, demonstraram o fraco sinal do siRNA fluorescente livre na pele, esses, reforçam a ideia da necessidade do desenvolvimento e uso de um carreador que possa interagir com as camadas da pele e entregar de forma eficiente o siRNA no citoplasma das células-alvo (DHARAMDASANI *et al.*, 2020; VIEGAS *et al.*, 2020).

Em suma, os estudos *in vitro* com modelo de pele suína demonstraram que a formulação NPL-TPPS2a-siRNA conseguiu, com sucesso, internalizar o siRNA e o FS nas camadas da pele, principalmente no estrato córneo e epiderme, validando o seu potencial como sistema tópico para veiculação da terapia gênica por siRNA associada à internalização fotoquímica.

4.8. Avaliação da eficácia do silenciamento do TNF α em modelo *in vivo* de psoríase após o tratamento com siRNA TNF α veiculado pelas NPLs associadas a internalização fotoquímica

A eficácia *in vivo* das NPLs em liberar cutaneamente o siRNA TNF α na pele e, conseqüentemente, silenciar a citocina TNF α foi avaliada pela determinação do efeito do siRNA incorporado nesse sistema contra o aumento nos níveis cutâneos de TNF α em um modelo de psoríase. O modelo utilizado nesta pesquisa foi previamente publicado pelo grupo (VIEGAS *et al.*, 2020). Basicamente, consiste na aplicação tópica diária de creme IMQ (65 mg no total), que é um creme potente para ativar o sistema imunológico, capaz de induzir e exacerbar sinais clínicos típicos da psoríase, doença inflamatória cutânea crônica. Esse modelo de psoríase utilizando IMQ é um modelo de sucesso para indução de placas psoriáticas (DESAI *et al.*, 2013). A aplicação consecutiva do creme na pele de camundongos induz sinais clínicos

inflamatórios semelhantes aos observados nas placas psoriáticas, como rubor, descamação, vermelhidão, infiltrado inflamatório, aumento da produção de citocinas inflamatórias e da espessura da epiderme (VAN DER FITS *et al.*, 2009).

Os animais submetidos a esse modelo foram usados nos estudos *in vivo* da avaliação da eficácia das formulações no silenciamento do siRNA TNF α veiculado pelas NPLs associadas a internalização fotoquímica pela ativação do TPPS2a no interior das células. Para essa avaliação, foram verificados os aspectos das lesões psoriáticas, a quantificação da citocina pró-inflamatória TNF α e as alterações morfológicas das peles (análise histológicas) após os tratamentos. As lesões psoriáticas foram qualificadas pelo índice de área e severidade da psoríase (PASI), que é um sistema de pontuação para avaliação clínica da psoríase essencial para avaliação do prognóstico da doença, além de ser aceito como padrão ouro na clínica médica. Esse índice é determinado pela avaliação da área de pele afetada pela doença e por 3 sintomas: vermelhidão, descamação e espessura da placa psoriática (SHRIVASTAVA *et al.*, 2015; RENDON; SCHÄKEL, 2019). O eritema, a descamação e o espessamento da pele foram pontuados em uma escala de 0 a 4, onde 0 = nenhum; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = marcado; e 4 = inflamação grave diária (BOAKYE *et al.*, 2017). As escalas do PASI diárias de cada grupo se encontram resumidas nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Escala diária do PASI induzida por IMQ em camundongos *Hairless* tratados sem irradiação

Grupos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Psoríase	0	2	3	4
Controle	0	0	0	0
NPL-TPPS2a	0	1	2	3
NPL-TPPS2a siRNA TNFα	0	0	1	1
NPL-siRNA TNFα	0	0	1	2
siRNA TNFα livre	0	2	3	4

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 12 – Escala diária do PASI induzida por IMQ em camundongos *Hairless* tratados com irradiação

Grupos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Psoríase	0	1	1	2
Controle	0	0	0	0
NPL-TPPS2a	0	1	1	2
NPL-TPPS2a siRNA TNFα	0	0	0	1

Fonte: elaborada pela autora.

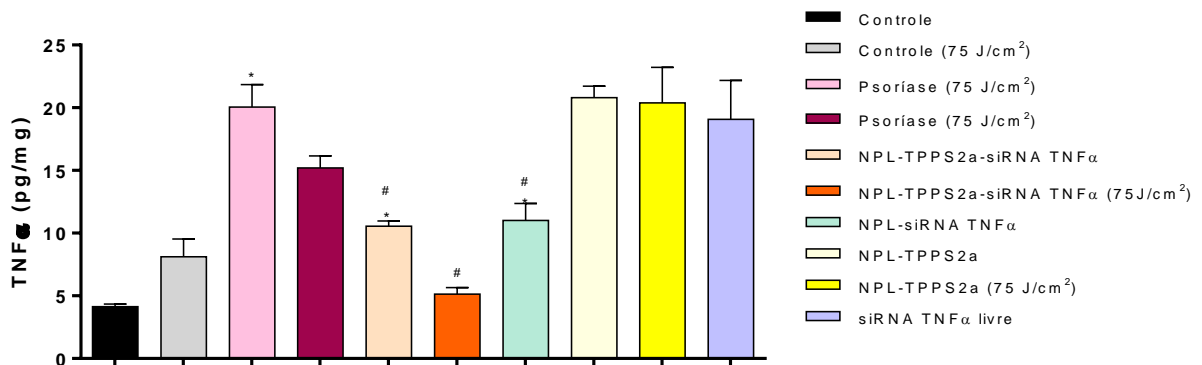
O tratamento tópico utilizando creme IMQ 2x/dia durante 4 dias consecutivos foi capaz de aumentar, de forma tempo-dependente, os parâmetros avaliados no PASI, como vermelhidão, descamação e engrossamento da pele. Após 24 horas de indução (dia 1), já foi possível observar o avermelhamento da pele do dorso dos camundongos. A partir do 3^o ou 4^o dia, houve nítido aumento da inflamação cutânea, com sinais de eritema (inflamação mais grave), descamação e espessura da pele, em alguns grupos de animais, especialmente no grupo psoríase (sem tratamento), nos grupos tratados com NPL-TPPS2a (com e sem irradiação) e no grupo tratado com siRNA TNF α livre. Para os demais, a inflamação não foi mais que moderada, e o grupo tratado com NPL-TPPS2a-siRNA TNF α com irradiação mostrou baixo sinal de inflamação. Também foi observada diferença entre os grupos tratados no escuro e os tratados com luz, demonstrando que a luz é um importante fator no tratamento da psoríase.

4.8.1. Avaliação da eficácia do siRNA TNF α veiculado pelas NPLs por quantificação dos níveis de TNF α por ELISA

A citocina pró-inflamatória TNF α presente na pele dos dorsos dos camundongos foi quantificada por ELISA. O TNF α é um importante marcador da psoríase e é considerado uma das citocinas mais importantes do processo inflamatório psoriático (BRACKE *et al.*, 2013). O tratamento diário com o creme de IMQ por 4 dias consecutivos foi capaz de induzir aumento significativo nos níveis da citocina TNF α na pele dos camundongos, corroborando outros trabalhos já publicados

(VAN DER FITS *et al.*, 2009; DESAI *et al.*, 2013; VIEGAS *et al.*, 2020). Os resultados dos níveis de TNF α dos grupos tratados sem e com irradiação na região do azul estão representados na Figura 32.

Figura 32 - Quantidade de TNF α mensurada nos tecidos por ELISA, em modelo de psoríase usando creme IMQ



Fonte: elaborada pela autora.

Grupos tratados com e sem irradiação (n = 3 animais por grupo). Concentração final de siRNA de 10 μ M. *p<0,05 em relação ao grupo controle (sadio), #p<0,05 em relação ao grupo psoríase (doente)

Os resultados da Figura 32 mostram a eficácia do creme IMQ em aumentar os níveis de TNF α nos tecidos, pois o grupo psoríase (sem tratamento) apresentou uma concentração 4 vezes maior dessa citocina em relação ao grupo controle (sadio). Em relação aos tratamentos, não houve diferença significativa entre o grupo psoríase e os grupos tratados com NPL-TPPS2a e o siRNA TNF α livre (solução aquosa), demonstrando que a diminuição dos níveis de TNF α é apenas obtida quando há siRNA TNF α na formulação, e quando este é internalizado nas células. O siRNA TNF α não é capaz de penetrar a pele e nem internalizar nas células quando se encontra na forma livre, por isso não foi observado silenciamento específico nos grupos tratados com siRNA TNF α livre (solução aquosa). No entanto, nos tratamentos com as NPL-TPPS2a-siRNA TNF α e as NPL-siRNA TNF α , observou-se uma diminuição significativa dos níveis de TNF α quando comparados ao grupo psoríase.

A internalização fotoquímica é uma tecnologia que melhora o escape endossomal de moléculas que estão dentro de vesículas endossomais. É dependente da concentração de FS e do tempo de exposição à irradiação para resultar na liberação de siRNA no citosol. A internalização fotoquímica surgiu pela primeira vez como uma nova tecnologia para a liberação de diversas moléculas no citosol em 1999

(BERG *et al.*, 1999). Desde então, muitos estudos têm sido publicados mostrando que essa técnica pode ser utilizada *in vitro* e *in vivo* para otimizar a liberação de macromoléculas (SELBO *et al.*, 2010). O primeiro trabalho que utilizou essa técnica para aumentar o escape endossomal de siRNA foi publicado em 2007 (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Estudos tem mostrado um potente silenciamento gênico promovido por siRNA com tratamentos que envolvem a internalização fotoquímica (OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; RAEMDONCK *et al.*, 2009; RAEMDONCK *et al.*, 2010). Oliveira *et al.* (2008) realizaram um estudo com lipoplexos para entrega de siRNA por via intravenosa para o tratamento de câncer, utilizando a internalização fotoquímica para otimizar o escape endossomal do siRNA no interior das células, e sua estratégia se mostrou promissora, pois nos resultados *in vivo* o tratamento envolvendo siRNA juntamente com as subdoses de FS e irradiação obteve um menor volume de tumor quando comparado com o controle. No entanto, os autores enfatizam que parâmetros como dose de FS e dose de luz, tipo de carreador usado e número de tratamentos, são algumas das variáveis que requerem otimização e estudos para diferentes aplicações (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

O tratamento envolvendo exposição à luz (75 J/cm^2) foi realizado apenas nos grupos que apresentavam o TPPS2a na formulação, juntamente com os controles (sadio e doente), uma vez que a luz é um componente da internalização fotoquímica. Foi notada uma diminuição dos níveis de TNF α no grupo psoríase tratado somente com irradiação ($\sim 15 \text{ pq/mg}$), quando comparado ao mesmo grupo tratado sem irradiação ($\sim 20 \text{ pq/mg}$). A fototerapia é considerada uma alternativa de tratamento para a psoríase quando se encontra na forma leve, isso explica o caimento nos níveis de TNF α encontrados nos grupos doentes tratados apenas com irradiação.

A irradiação no comprimento de onda de 420 nm (região do azul) foi escolhida pois os FS da família das porfirinas possuem alta absorção de energia nessa região (LILLETVEDT *et al.*, 2011), e esta condição é desejável para otimizar os efeitos da internalização fotoquímica. Além disso, a luz azul não possui alto poder de penetração na pele, por isso não atinge as camadas mais profundas como a derme, o que era desejado neste estudo, pois o tratamento tinha como foco as camadas mais superficiais, estrato córneo e a epiderme (ZHANG; WU, 2018).

Estudos mostram que a luz na faixa do azul (420-480 nm) consegue tratar as placas psoriáticas quando a doença se apresenta na forma moderada. Isso porque a luz azul pode reduzir a atividade proliferativa dos queratinócitos e modular as

respostas imunológicas das células T, melhorando, assim, as placas psoriáticas (WEINSTABL *et al.*, 2011, PFAFF *et al.*, 2015). Kleinpenning *et al.* (2012) publicaram um estudo comparativo com pacientes tratados com altas doses de luz azul e luz vermelha (~630 nm) e observaram uma melhora clínica (escamação e espessamento da pele) após o tratamento com ambas as luzes, sendo a luz azul eficiente na melhoria do eritema, enquanto a luz vermelha não apresentou melhora significativa nesse quesito.

Entretanto, na pele sadia, a luz aumenta as células inflamatórias e danos no DNA após a irradiação (KLEINPENNING *et al.*, 2009). Outro estudo com cultura de células de queratinócitos e exposição à irradiação na região do azul mostrou aumento da produção de EROs e de mediadores inflamatórios (DONG *et al.*, 2019). Esses dados corroboram o observado neste trabalho, pois houve um pequeno aumento dos níveis de TNF α no grupo controle (sadio) tratado com luz, quando comparado com o mesmo grupo tratado sem luz.

O tratamento NPL-TPPS2a-siRNA TNF α com irradiação foi mais efetivo na diminuição dos níveis de TNF α quando comparado com o mesmo tratamento na ausência de luz. De fato, os resultados da formulação NPL-TPPS2a-siRNA TNF α com 75 J/cm² de dose energética foram comparáveis com os níveis basais de TNF α (controle sadio, sem luz). Estes resultados comprovam que a internalização fotoquímica empregada pode ter otimizado o escape endossomal do siRNA no citoplasma, resultando, assim, em um maior silenciamento do RNAm TNF α , o que explica a menor concentração encontrada dessa citocina no tecido inflamado.

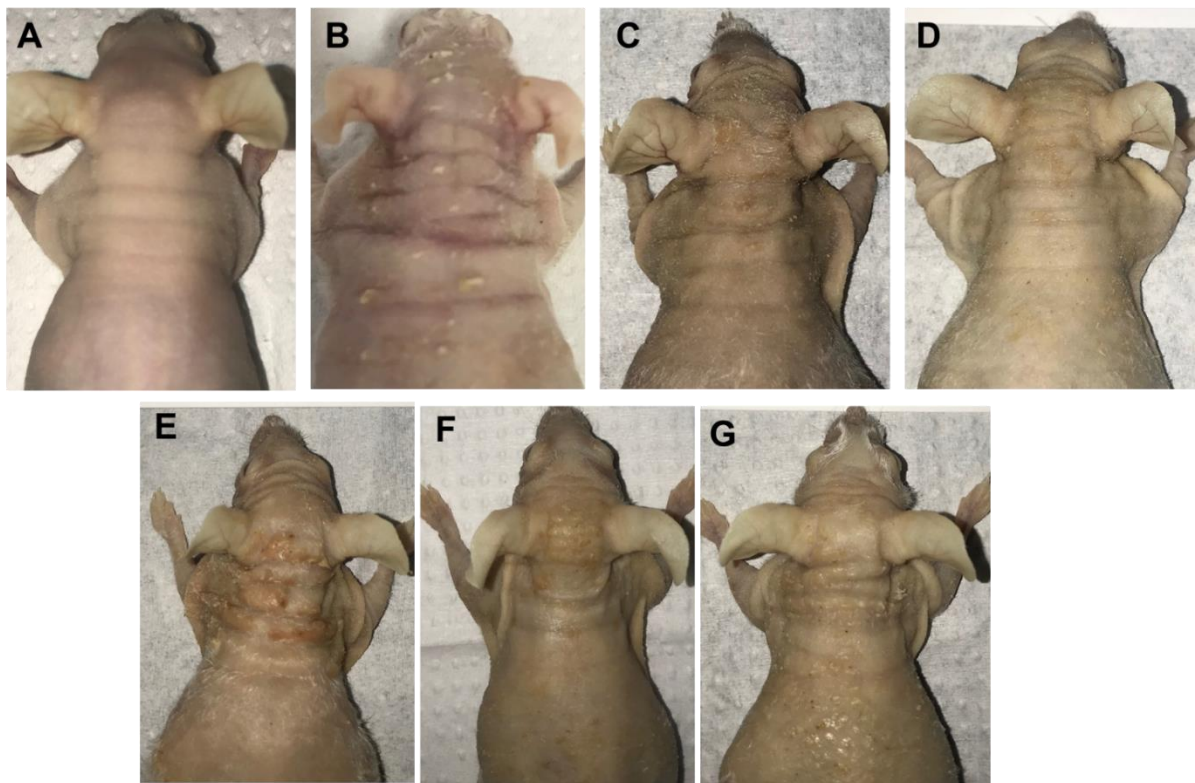
Esses resultados reforçam a aplicabilidade e efetividade das NPLs como sistema de liberação tópica para siRNA, como, também, a especificidade do mecanismo de RNAi, uma vez que os níveis de TNF α foram apenas reduzidos com o uso do siRNA específico.

4.8.2. Análise macroscópica das lesões e análises histológicas dos tecidos provenientes do modelo *in vivo* de psoríase

Além da avaliação dos níveis de TNF α nos tecidos, verificaram-se macroscopicamente as lesões nos dorsos dos animais frente aos diferentes tratamentos (Figura 33). O fenótipo característico da doença psoríase (escamação, vermelhidão, eritema) foi observado após tratamento com o creme IMQ (Figura 33B),

corroborando outros trabalhos já publicados (VAN DER FITS *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2018; VIEGAS *et al.*, 2020). Também foi notável a melhora nesse fenótipo no grupo tratado com a formulação de NPL-TPPS2a-siRNA TNF α com aplicação da luz azul (Figura 33D), em que foi possível observar redução na escamação e no rubor da pele, em comparação ao grupo psoríase (doente) e aos demais tratamentos. O silenciamento do TNF α reforça o conceito de que essa citocina inflamatória desempenha um importante papel na psoríase, inclusive com ação sobre a proliferação elevada de queratinócitos (COIMBRA *et al.*, 2012). Assim, pode-se afirmar que a redução dos níveis de siRNA TNF α foi essencial para a melhora fenotípica observada nos animais tratados com essa terapia.

Figura 33 - Imagens das inflamações cutâneas nos camundongos *Hairless* tratados diariamente com creme IMQ e seus tratamentos



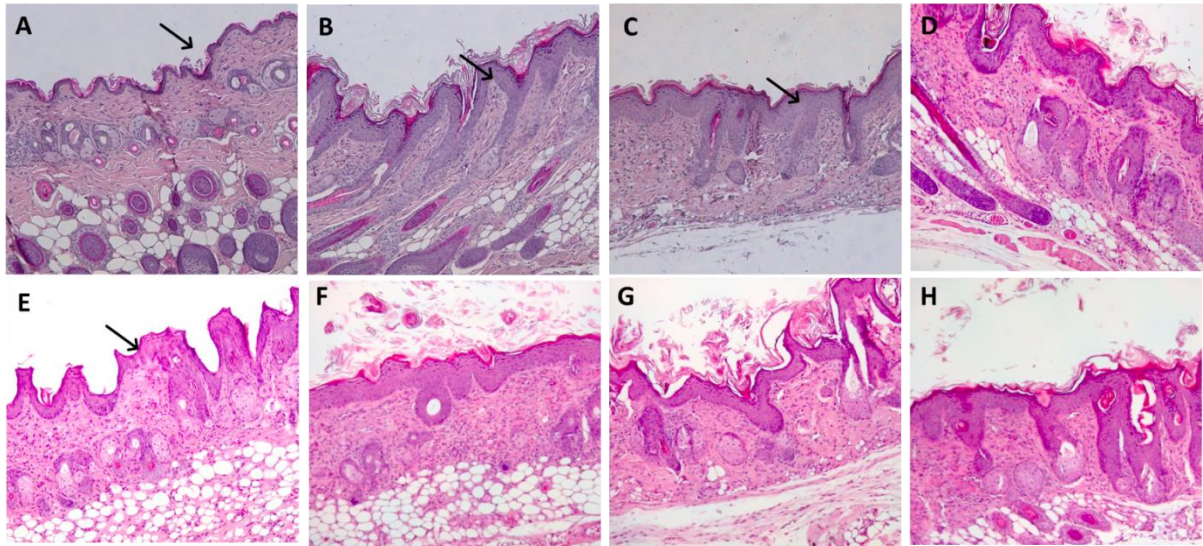
Fonte: elaborada pela autora.

A) nenhum tratamento (sadios); B) IMQ; C) IMQ + NPL-TPPS2a-siRNA TNF α ; D) IMQ + NPL-TPPS2a-siRNA TNF α + 75 J/cm 2 ; E) IMQ + NPL-TPPS2a; F) IMQ + NPL-TPPS2a + 75 J/cm 2 ; G) IMQ + NPL após 4 dias consecutivos de tratamento, inflamação cutânea induzida por creme IMQ é semelhante fenotipicamente à psoríase.

A análise histológica dos tecidos do dorso dos animais foi realizada para verificar as alterações que as camadas da pele (estrato córneo, epiderme e derme)

poderiam sofrer com a indução da psoríase e os tratamentos. As imagens das secções das peles corroboram o fenótipo observado nos animais (Figura 34).

Figura 34 - Imagens histológicas da pele dorsal dos camundongos *Hairless* tratados com creme IMQ e seus tratamentos



Fonte: elaborada pela autora.

A) nenhum tratamento (sadio); B) IMQ (psoríase); C) IMQ + siRNA TNF α livre; D) IMQ + NPL-TPPS2a-siRNA TNF α ; E) IMQ + NPL-TPPS2a-siRNA TNF α + 75 J/cm 2 ; F) IMQ + NPL-siRNA TNF α ; G) IMQ + NPL-TPPS2a; H) IMQ + NPL-TPPS2a + 75 J/cm 2 . Os cortes foram visualizados por microscopia de luz convencional na objetiva de 100X

A indução da psoríase com o creme IMQ foi capaz de desenvolver características típicas dessa doença na epiderme, como acantose (hiperplasia da epiderme); hiperkeratose (hiperplasia da camada córnea); parakeratose (processo anormal de maturação das células epiteliais, em que ocorre a retenção de núcleos na camada córnea); e alongamento das papilas dérmicas (Figura 34B). Observou-se também um aumento de células inflamatórias na derme, em concordância com características histológicas encontradas na psoríase (SUN *et al.*, 2018).

Analisando as imagens, é possível verificar um aumento da espessura da epiderme em todos os grupos tratados com creme IMQ quando comparados com o grupo controle (sem tratamento, sadio). Esse aumento na espessura é resultado da proliferação elevada de queratinócitos com diferenciação anormal, devido à ação das citocinas inflamatórias, como já observado em outros trabalhos que utilizaram o modelo de psoríase induzida por IMQ (DESAI *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2018; VIEGAS *et al.*, 2020). Esse aumento da espessura da epiderme foi observado em praticamente todos os grupos, exceto o grupo controle (sadio).

O tratamento com NPL-TPPS2a-siRNA TNF α com irradiação foi o que mais se assemelhou a uma epiderme saudável, com um aumento da espessura da epiderme menor em relação aos demais grupos. A eficácia do tratamento com NPL-TPPS2a-siRNA TNF α associado à fotointernalização induzida foi comprovada nos aspectos morfológicos (macroscópico e histológico), bem como no silenciamento da produção de TNF α . O conjunto de resultados mostra o potencial das nanopartículas híbridas polímero-lipídicas desenvolvidas para associar a liberação tópica do siRNA com a internalização fotoquímica na terapia tópica da psoríase.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que:

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

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

- no ensaio de retenção cutânea *in vitro* com modelo de pele suína, as NPL-TPPS2a-siRNA Alexa647 levaram a um maior acúmulo do siRNA e TPPS2a nas camadas da pele (estrato córneo e epiderme viável), o que é desejável em sistemas que têm como foco de ação as células da epiderme para um silenciamento eficaz;
- a aplicação tópica da formulação NPL-TPPS2a-siRNA TNF α com uma dose energética de 75 J/cm² em modelo *in vivo* de psoríase induzida por IMQ em camundongos *Hairless* foi o protocolo de tratamento que demonstrou maior eficácia no silenciamento da citocina TNF α quando comparado com os demais tratamentos;
- os resultados de silenciamento da citocina TNF α foram acompanhados pela melhora fenotípica dos animais tratados com NPL-TPPS2a-siRNA TNF α e dose energética de 75 J/cm², com redução do rubor e descamação, e as análises histológicas demonstraram uma redução da acantose e paraceratose, resultantes da redução do processo inflamatório.

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BOAKYE, C. H. A.; PATEL, K.; DODDAPANENI, R.; BAGDE, A.; MAREPALLY, S.; SINGH, M. Novel amphiphilic lipid augments the co-delivery of erlotinib and IL36 siRNA into the skin for psoriasis treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 246, p. 120-132, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAVALCANTI, S. M. T.; NUNES, C.; COSTA LIMA, S. A.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; REIS, S. Optimization of nanostructured lipid carriers for Zidovudine delivery using a microwave-assisted production method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 122, p. 22-30, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; PRAÇA, F. S. G.; DEL CIAMPO, J. O.; FANTINI, M. A. C.; FONSECA, M. J. V.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid crystalline nanodispersions functionalized with cell-penetrating peptides for topical delivery of short-interfering RNAs: a proposal for silencing a pro-inflammatory cytokine in cutaneous diseases. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, p. 1063-1073, 2016.

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

PRAÇA, F. S. G.; MEDINA, W. S. G.; ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; CAMPOS, P. M.; ASCENSO, A.; BENTLEY, M. V. L. B. Evaluation of critical parameters for *in vitro* skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121-132, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TOFANI, L. B.; DEPIERI, L. V.; CAMPOS, P. M.; RIUL, T. B.; ANTONIETTO, K. S.; FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M. V. L. B. *In vitro* tyRP-1 knockdown based on siRNA carried by liquid crystalline nanodispersions: an alternative approach for topical treatment of vitiligo. **Pharmaceutical Research**, v. 35, p. 1-13, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXOS

Prof. Samir Mitragotri
Hiller Professor of Bioengineering
Wyss Professor of Biologically Inspired Engineering
Harvard University

August 11, 2019

Process PDSE 88881.190325/2018-01, Brazil

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes),

This letter serves to summarize the research activities of the PhD student Isabella Luiz Suzuki who was a fellow visiting researcher at John A. Paulson School of Engineering & Applied Sciences, Harvard University, supervised by me, Prof Dr. Samir Mitragotri, during the period of November 2018 to April 2019. During these six months, Isabella demonstrated remarkable dedication, motivation and hard work towards her project. She deigned her research goals, planned the experiments and successfully executed the research. Over the years, I have worked with over 100 trainees in my laboratory, and against this background, I can say with confidence that Isabelle is an exceptionally talented and dedicated student. I am extremely pleased with her performance in my laboratory during her visit to Harvard University.

The following is a summary of Isabella's activities during her time at Harvard:

1. Synthesis of ionic liquid named CAGE used throughout her experiments.
2. Physical properties of CAGE were studied including structure, viscosity and conductivity. For characterization, NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) was used to assess the structure, a TA instrument AR-G2 rheometer was used to measure the viscosity and a Horiba Laqua conductivity meter was used to measure the conductivity.
3. siRNA stability in CAGE was assessed using agarose gel electrophoresis method.
4. CAGE penetration into skin was assessed using porcine skin in Franz Diffusion Cells (FDCs). This study was conducted to assess whether CAGE enhances delivery of siRNA labeled into the skin.

5. The ability of CAGE to enhance siRNA skin penetration was quantitatively assessed using a siRNA labeled with Cy5, by the signal of the fluorescein.
6. Confocal images were obtained to measure the penetration into skin.
7. *In vivo* study was conducted in hairless mice to check the ability of CAGE to deliver siRNA into skin.
8. Establishment of the psoriasis model in mice using IMQ cream.

Through this experience, Isabella enhanced her understanding in some methods and technology related to her research, improving your knowledge in this area. If any other information is necessary, you may contact me

Sincerely,



Samir Mitragotri, Ph.D.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO


Certificamos que a proposta intitulada "Nanopartículas lipídicas sólidas para liberação de siRNA-TNF-alfa associada à internalização fotoquímica no tratamento tópico da psoríase", registrada sob nº 19.1.135.60.7, sob a responsabilidade de 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 nº 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 05/07/2019 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.

Colaboradores: Isabella L. Suzuki, Juliana dos S. Rosa e Fabíola S. G. Praça.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	15/07/2019 a 15/06/2020
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico Hairless HRS/J
Nº de animais	30
Peso/Idade	20-25 g/ 6-8 semanas
Sexo	Ambos/ indiferente
Origem	Biotério I FCFRP-USP

Ribeirão Preto, 10 de julho de 2019.


Ana Patrícia Yatsuda Natsui
 Coordenadora da CEUA-FCFRP

