

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 21/05/2026



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

André Miguel Martinez Junior

Nanopartículas multifuncionais para liberação de siRNA no tratamento de doenças dérmicas: Estudos em modelos *in vitro* e *in vivo* de psoríase induzida

São José do Rio Preto

2024

André Miguel Martinez Junior

Nanopartículas multifuncionais para liberação de siRNA no tratamento de doenças dérmicas: Estudos em modelos *in vitro* e *in vivo* de psoríase induzida

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2019/27801-0

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Tiera

São José do Rio Preto

2024

M385n	Martinez Junior, André Miguel Nanopartículas multifuncionais para liberação de siRNA no tratamento de doenças dérmicas : estudos em modelos in vitro e in vivo de psoríase induzida / André Miguel Martinez Junior. -- São José do Rio Preto, 2024 201 f. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Marcio José Tiera 1. Ácido nucleico. 2. Silenciamento. 3. Terapia gênica. 4. Nanocarreadores. 5. Quitosana. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

André Miguel Martinez Junior

Nanopartículas multifuncionais para liberação de siRNA no tratamento de doenças dérmicas: Estudos em modelos *in vitro* e *in vivo* de psoríase induzida

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2019/27801-0

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Tiera

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio José Tiera
UNESP – São José do Rio Preto
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a Marisa Masumi Beppu
UNICAMP – Campinas

Prof.^a Dr.^a Rose Mary Zumstein Georgetto Naal
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP – São José do Rio Preto

Prof.^a Dr.^a Fátima Pereira de Souza
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

21 de maio de 2024

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo incessante apoio, que tem sido imprescindível nessa jornada de estudos.

À UNESP a toda sua comunidade, por me possibilitar a conquista de um diploma universitário e ter me direcionado nesta caminhada rumo ao término do doutorado.

Ao Prof. Dr. Marcio J. Tiera, pela orientação, confiança e amizade que vem sendo cultivada desde a iniciação científica. Agradecimento que também estendo à Profa. Dra. Vera A. O. Tiera, sempre disposta a nos ajudar.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2019/27801-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos bons amigos, que pude conhecer ao longo destes anos como unespiano, pelo companheirismo e ensinamentos que, além de contribuírem para o desenvolvimento deste trabalho, também foram fonte de engrandecimento pessoal.

A todos os professores, técnicos e colegas que me ajudaram na execução dos experimento e análise dos resultados. Ajuda, sem a qual não seria possível o andamento deste trabalho. Agradeço especialmente os grupos de pesquisa coordenados pelas Profas. Dras. Claudia Domingos, Marcela Lima, Marcia Cabrera, Marília Calmon e Patricia Vilamaior e pelos Profs. Drs. Geraldo Nery, João Ruggiero, Sebastião Taboga e Altair Moreira, pelo acesso à instrumentação, ajuda na execução dos experimentos e interpretação dos resultados. Expresso minha gratidão a todos os membros do Laboratório de Microscopia e Microanálise (IBILCE/UNESP), em especial, ao doutorando Thalles Ruiz pela ajuda essencial na execução dos experimentos *in vivo*. Também agradeço as imprescindíveis contribuições das equipes da central de análises químicas (CAQI) de São Carlos e do laboratório de microscopia eletrônica da UNESP de Araraquara na obtenção dos resultados.

E é claro, agradeço aos colegas que vieram antes de mim que, mesmo que eu não tenha conhecido pessoalmente, contribuíram com o andamento deste projeto por meio do excelente trabalho que realizaram.

Aos membros da banca examinadora, por se disponibilizarem em avaliar e contribuir para melhoria deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

Ao longo da última década, os avanços na engenharia do RNA possibilitaram a geração de pequenos RNAs de interferência (siRNA) com atividade farmacológica melhorada, o que tem impulsionado um crescente número de estudos que visam utilizá-las para o desenvolvimento de plataformas terapêuticas para variadas doenças, como a psoríase. Contudo, a eficácia do tratamento terapêutico ainda está condicionada à utilização de nanocarreadores capazes de entregar de forma eficiente o siRNA no citosol das células-alvo, mediante a superação dos vários obstáculos que se iniciam no momento de sua aplicação nos sistemas biológicos. Neste estudo, foram sintetizados polímeros multifuncionais baseados em quitosana para serem aplicados no desenvolvimento de duas séries de nanocarreadores de siRNAs. Na Série I, a quitosana foi substituída com grupos diisopropiletilamina (DIPEA) e tiol (-SH) e foram utilizadas para revestir nanopartículas de ouro (AuNPs), as quais foram aplicadas no transporte do siRNA. Já na Série II, as DIPEA-quitosanas foram enxertadas com polietilenoglicol tiolado (PEG-SH) para geração dos nanocarreadores de siRNA através da simples complexação dos ácidos nucleicos. A composição dos polímeros foi determinada por diferentes técnicas espectrométricas (RMN ^1H , FTIR e UV-Vis) e confirmadas via análise elementar (CHNS). Os derivados de quitosana apresentaram conteúdo de DIPEA variados (14-59%), tiolação entre 1-2% (Série I) e PEGuilação próxima a 1% (Série II). Em ambas as séries, os nanocarreadores de siRNA apresentaram tamanhos entre 100-200 nm e carga superficial positiva (8 a 12 mV), as quais puderam ser precisamente controladas por meio de ajustes na composição dos derivados de quitosana e pelo pH das formulações. As nanoplateformas complexaram eficientemente o siRNA, minimizando a degradação dos ácidos nucleicos pela ação dos radicais hidroxila e pelo ataque da RNase, além de apresentarem elevada estabilidade estrutural e coloidal na presença de proteínas séricas. Adicionalmente, observou-se que os polímeros liberaram o PEG-SH em ambiente redutor e apresentaram biodegradabilidade similar à da quitosana frente ao ataque da lisozima, o que embasou uma possível via de liberação intracelular do siRNA. Os vetores apresentaram baixa citotoxicidade em diferentes linhagens celulares e mediarão níveis de silenciamento de proteína verde fluorescente (GFP) em células HeLa ($\leq 50\%$) e do fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) em macrófagos RAW ($\leq 60\%$) similares aos alcançados pela LipofectaminaTM. Formulações para uso tópico contendo os vetores da Série II aumentaram em até 4 vezes a retenção do siRNA em modelos de pele artificial (Strat-M[®]) e de origem animal (orelha de porco). Esses resultados foram corroborados pelos estudos *in vivo* em gerbilos da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), que revelaram a presença de nanopartículas em diferentes camadas da epiderme/derme e indicaram que os folículos capilares são uma importante via para penetração dos nanocarreadores na pele. O uso tópico destas formulações carregadas com siRNA anti- $\text{TNF}\alpha$ melhoraram o aspecto geral da pele de modelos animais com psoríase induzida via Imiquimod, diminuindo a infiltração de células, a densidade de vasos sanguíneos e a concentração de $\text{TNF}\alpha$ no local da inflamação. Os resultados obtidos destacam o potencial dos vetores no desenvolvimento de formulações de uso tópico, em especial, aquelas voltadas para o tratamento da psoríase.

Palavras-chave: Ácido nucleico. Silenciamento. Terapia gênica. Nanocarreadores. Quitosana.

ABSTRACT

Over the last decade, advances in RNA engineering have enabled the generation of small interfering RNAs (siRNA) with improved pharmacological activity, which has driven a growing number of studies that aim to use them for the development of therapeutic platforms for various diseases such as psoriasis. However, the success of the therapeutic treatment still depends on the use of nanocarriers able to deliver siRNA efficiently into the cytosol of the target cells, by overcoming the various obstacles that start at the moment of its biological application. In this study, multifunctional chitosan-based polycations were synthesized and applied for the development of two series of siRNA nanocarriers. In Series I, chitosan was modified with diisopropylethylamine (DIPEA) and thiol (-SH) groups and used to coat gold nanoparticles (AuNPs), which were used to transport the siRNA. In Series II, DIPEA-chitosans were grafted with thiolated polyethylene glycol (PEG-SH) to formulate siRNA nanocarriers by a simple complexation process of nucleic acids. The composition of the polycations was determined by different spectrometric techniques (^1H NMR, FTIR and UV-Vis) and confirmed by elemental analysis (CHNS). The chitosan derivatives presented varied DIPEA content (14-59%), thiolation degree between 1-2% (Series I) and PEGylation close to 1% (Series II). In both series, the siRNA nanocarriers presented 100-200 nm size ranging and positive surface charge (8 a 12 mV), which were precisely controlled by adjusting the composition of polymers and the pH of the formulations. The nanoplateforms efficiently load the siRNA molecules, reducing their degradation by hydroxyl radicals action and by RNase attack, and formulated nanopolyplexes with high structural and colloidal stability in presence of serum proteins. In addition, the derivatives were able to release the PEG-SH coat in reducing environments and also presented a biodegradability similar to the unmodified chitosan face of lysozyme attack, which supported a possible pathway for the intracellular release of siRNA. The formulation of vectors displayed very low cytotoxicities in different cell lines and mediated knockdown levels of green fluorescent protein (GFP) in HeLa cells (up to 50%) and tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF}\alpha$) in RAW macrophages (up to 60%) similar to those achieved by LipofectaminaTM. The topical formulations of the vectors from Series II increased up to 4-fold the amount of siRNA retained in artificial (Strat-M[®]) and animal (pig ear) skin models. These results were corroborated *in vivo* studies in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*), which revealed the presence of the nanoparticles in different layers of the epidermis/dermis and indicated that the hair follicles are an important route for the penetration of nanocarriers into the skin. The topical use of these formulations loaded with anti- $\text{TNF}\alpha$ siRNA improved the overall appearance of the skin of animal models with Imiquimod-induced psoriasis, decreasing the infiltration of cells, the density of blood vessels and the concentration of $\text{TNF}\alpha$ cytokine at the inflamed tissue. The results obtained highlight the potential of the vectors in the development of formulations for topical use, especially those aimed at the treatment of psoriasis.

Keywords: Nucleic acid. Knockdown. Gene therapy. Nanocarriers. Chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (a) Vetor polimérico aplicado no transporte do siRNA com (b) esquema ilustrativo do seu mecanismo de ação. Ilustração da capacidade dos vetores em (c) proteger o siRNA da degradação por nucleases, facilitar sua permeação epidérmica e (d) favorecer seu escape endossomal. (e) Legenda.	22
Figura 2 - (a) Estrutura química dos polications da Série I, com indicação das principais funções de cada mero. (b) Formação do vetor híbrido estruturado com ouro e DIPEA-quitosana e (c) esquema da desmontagem intracelular do nanocarreador em resposta glutatona reduzida.	27
Figura 3 - (a) Estrutura química dos polications da Série II, com indicação das principais funções de cada mero. (b) Formação do vetor polimérico pela simples complexação do siRNA pelo polication e (c) escape endossomal responsivo à glutatona.	28
Figura 4 - Esquema da reação de substituição com DIPEA.	45
Figura 5 - Esquema da reação de tiolação. Para simplificação, os polímeros são representados apenas pela unidade desacetilada (GlcN).	46
Figura 6 – (a) Espectros de FITR dos DIPEA-derivados de quitosana da Série I. (b-e) Recorte dos espectros entre 1800-900 cm ⁻¹ , destacando a intensidade das bandas em (I) 1555 e (II) 1320 cm ⁻¹	48
Figura 7 – Espectros de RMN ¹ H dos DIPEA-derivados de quitosana da Série I.	50
Figura 8 – (a) Esquema da reação entre os grupo tiol e o reagente de Ellman. (b) Curva analítica com os padrões de cisteína. Espectros UV-Vis representativos (c) do solvente, da solução do reagente de Ellman e da cisteína, e dos derivados de quitosana (d) não tiolados e (e) tiolados, empregados na determinação do grau de substituição por grupos tiol (GS _{SH}).	53
Figura 9 - Cromatogramas de GPC dos DIPEA-derivados de quitosana da Série I. O tempo de retenção das amostras está destacado em amarelo.	56
Figura 10 - (a) Grau de ionização dos grupos amina presentes nos DIPEA-derivados de quitosana, em função do pH (sombreado em vermelho: faixa de pH da endocitose). (b) Eficiência antioxidante (AOE) das quitosanas tioladas, avaliada pelo ensaio com ABTS.	58
Figura 11 - Diâmetro hidrodinâmico (Dh) e potencial Zeta (ζ) das AuNPs revestidas por (a) Ch-SH, (b) ChD33-SH e (c) ChD56-SH. (d) Dh das diferentes AuNP@polímero revestidas na razão mero/AuNP = 500x10 ³ . Distribuições representativas do (e) ζ e do (f) Dh de AuNPs não revestidas (<i>uncoated</i>) e da AuNP@ChD33-SH em diferentes razões mero/AuNP (estudo realizado em triplicata, e cada linha de distribuição representa uma amostra). Todas as suspensões de nanopartículas foram avaliadas em água ultrapura (pH 6-7).	60
Figura 12 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) representativas de AuNPs (a, b) sem revestimento e revestidas pelo (c) ChD56-SH e (d) ChD33-SH na razão mero/AuNP = 500x10 ³ (em água ultrapura). (e) MEV da AuNP@ChD33-SH, onde o "X" vermelho marca o ponto no qual foi realizada a análise de (f) espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS). Input (b, c, d): ampliação das nanopartículas com coloração baseada na delimitação manual de sua estrutura (amarelo = “ <i>gold core</i> ”; azul = “ <i>polymer shell</i> ”).	61

Figura 13 - (a) Diâmetro hidrodinâmico (Dh) das AuNPs revestidas em diferentes razões mero/AuNP (pH 7,4; I = 150 mmol L⁻¹). **(b)** Dh e **(c)** potencial Zeta de AuNPs não revestidas (*uncoated*) e revestidas (mero/AuNP = 500×10³) em diferentes tampões (pH 5,5; 6,3 e 7,4; I = 150 mmol L⁻¹). Espectros de absorção UV-Vis representativos das suspensões de **(d)** AuNPs não revestidas e **(e)** AuNPs@ChD56-SH em NaCl 150 mmol L⁻¹. **(f)** Representação esquemática dos efeitos do revestimento polimérico na carga superficial das AuNPs e em sua estabilidade coloidal. 64

Figura 14 - (a) Eletroforese dos vetores híbridos formulados em diferentes razões N/P (1 a 20) em água ultrapura. Fluorescência do siRNA-FAM **(b)** após sua complexação por AuNPs revestidas (AuNP@polímero) e **(c)** após o tratamento dos vetores híbridos com concentrações crescentes de heparina (ambos os estudos foram realizados em pH 7,4; I = 150 mmol L⁻¹). 66

Figura 15 – (esquerda) Potencial Zeta e **(direita)** diâmetro hidrodinâmico de suspensões dos vetores híbridos (AuNP@polímero/siRNA) formulados com **(a, b)** AuNP@Ch-SH, **(c, d)** AuNP@ChD33-SH e **(e, f)** AuNP@ChD56-SH em várias razões N/P e em diferentes tampões (pH 5,5, 6,3 e 7,4; I = 150 mmol L⁻¹). 69

Figura 16 – Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos vetores híbridos AuNPs@ChD56-SH/siRNA formulados na razão N/P = 20 em tampão **(a, b)** fosfato (pH 7,4) e **(c, d)** acetato (pH 5,5), ambos com I = 150 mmol L⁻¹. 70

Figura 17 - Estudos de estabilidade ao longo do tempo. Diâmetro hidrodinâmico dos vetores híbridos em **(a)** pH 5,5 e **(b)** pH 7,4. Eletroforeses dos vetores AuNP@ChD56-SH/siRNA após o tratamento com **(c)** 25% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e **(d)** RNase A. Distribuição de tamanho (obtida via DLS) de suspensões de AuNP@ChD56-SH/siRNA na **(e)** ausência e **(f)** presença de albumina (estudo realizado em triplicata e cada linha de distribuição representa uma amostra). Os vetores híbridos foram formulados na razão N/P = 20, em diferentes tampões (pH 5,5 e/ou 7,4; I = 150 mmol L⁻¹). 72

Figura 18 – Viabilidade dos fibroblastos 3T3/NIH tratados com **(a)** derivados de quitosana e **(b)** AuNPs revestidas (AuNP@polímero) em diferentes concentrações, e com **(c)** vetores híbridos (AuNP@polímero/siRNA) formulados em razões N/P variadas, em pH 7,4 (I = 150 mmol L⁻¹). 75

Figura 19 – Imagens de CLSM representativas dos macrófagos RAW 264.7 tratados com siRNA-Cy5 (200 nmol L⁻¹) na **(a)** forma livre ou transportado pela **(b)** Lipofectamina™ 2000 e pela **(c)** AuNP@ChD56-SH (N/P = 20; pH 7,4 e I = 150 mmol L⁻¹). São mostradas imagens obtidas nos canais do DAPI e do Cy5 e a sobreposição (*merge*) de ambas. Barra de escala: 10 µm. 77

Figura 20 - (a) Viabilidade das células HeLa-GFP tratadas com os vetores híbridos (N/P = 20) formulados em diferentes tampões (dados obtidos via ensaio com MTS). Expressão de GFP pelas células HeLa-GFP tratadas com **(b)** siRNA livre, Lipofectamina™ e com os vetores híbridos formulados com **(c)** AuNP@ChD33-SH e **(d)** AuNP@ChD56-SH, na razão N/P = 20 (pH 5,5; 6,3 e 7,4; I = 150 mmol L⁻¹). A expressão de GFP pelas células tratadas com amostras de siNT foi utilizada para normalização dos dados (expressão de GFP = 1,0). A análise estatística (siNT versus siGFP) foi realizada utilizando o teste t de

Student não pareado, com um nível de significância de 0,05. **p<0,01, ***p<0,001 e NS= não houve diferenças significativas entre as médias.....	79
Figura 21 - Esboço do design experimental adotado para (a) aplicação tópica de vetores com marcações fluorescentes e (b) indução e tratamento da psoríase no dorso depilado de espécimes machos de gerbilos da Mongólia.	97
Figura 22 - Esquema da reação de PEGuilação. Para simplificação, os polímeros são representados apenas pela unidade desacetilada (GlcN).	99
Figura 23 - Espectros de FITR da (a) quitosana (Ch) e de sua análoga PEGuilada (Ch-Peg) e das (b) DIPEA-quitosanas enxertadas com PEG. As setas indicam as bandas cujas as intensidades de transmitância foram avaliadas.	101
Figura 24 - Espectros de RMN ^1H das quitosanas PEGuiladas (Série II).	102
Figura 25 - (a) Curva analítica com padrões de RITC e (b) espectro UV-Vis representativo de uma amostra de RITC/ChD56-Peg empregada na determinação do GS_{RITC} . Input (b): estrutura química representativa da unidade GlcN marcada com RITC.	103
Figura 26 - Cromatogramas de GPC dos DIPEA-derivados de quitosana da Série II. O tempo de retenção das amostras está destacado em amarelo.	106
Figura 27 - (a) Capacidade de consumo de H^+ e (b) potencial Zeta dos derivados PEGuilados de quitosana em função do pH. (c) Eficiência antioxidante (AOE) dos polímeros da Série II, avaliada via ensaio com ABTS.	108
Figura 28 - Espectros de RMN ^1H dos polímeros PEGuilados (a) antes e (b) após o tratamento com DTT. (c) Representação esquemática da influência do ambiente redutor e da ação da lisozima nos vetores poliméricos.	110
Figura 29 – (a) Eletroforese, (b) potencial Zeta e (c) diâmetro hidrodinâmico dos vetores poliméricos formulados em diferentes razões N/P (1 a 20). (d, e) Imagens de MEV-FEG representativas dos vetores formulados com o ChD59-Peg na razão N/P = 10. A área destacada em (d) é mostrada em maior aumento em (e) . Em todos os estudos, os vetores foram formulados em tampão fosfato (pH 7,4; I = 150 mmol L $^{-1}$).	114
Figura 30 - (a) Monitoramento do diâmetro hidrodinâmico dos vetores poliméricos ao longo do tempo. (b) Eletroforese de amostras dos vetores e do siRNA livre após o tratamento com albumina sérica bovina (BSA) em diferentes tempos. Distribuições de tamanho representativas (obtida via DLS) dos vetores na (c) ausência de proteínas e na (d) presença de BSA ao longo do tempo (estudos realizados em triplicata/duplicata, e cada linha de distribuição representa uma amostra). Os vetores foram formulados na razão N/P = 10, em tampão fosfato (pH 7,4; I = 150 mmol L $^{-1}$).	115
Figura 31 - Eletroforese de amostras dos vetores poliméricos e do siRNA livre após o tratamento com (a) RNase A, ao longo do tempo (até 60 minutos), e com (b) concentrações variadas de radicais $\bullet\text{OH}$, produzidos via reação de Fenton. Os vetores foram formulados na razão N/P = 10, em pH 7,4.	116

Figura 32 – (a) Monitoramento da viscosidade específica (η_{sp}) de soluções poliméricas tratadas com lisozima em diferentes intervalos de tempo. Os dados foram expressos em relação as amostras poliméricas não tratadas (controles). (b) η_{sp} de amostras de ChD33 degradadas via tratamento com lisozima e NaNO_2 . Eletroforese dos vetores poliméricos formulados com o ChD33 degradado, em (c) diferentes razões N/P e (d) tratados com diferentes concentrações de heparina.....	118
Figura 33 - Viabilidade dos (a, b) fibroblastos 3T3/NIH e dos (c, d) queratinócitos HaCaT tratados com (a, c) diferentes concentrações de polímeros e com (b, d) vetores poliméricos formulados em diferentes razões N/P. Todos os vetores foram formulados em tampão fosfato (pH 7,4; I = 150 mmol L ⁻¹). <i>Cell</i> : células não tratadas.....	120
Figura 34 - Imagens de CLSM representativas das (a, b) células HeLa-GFP (em diferentes topologias) e dos (c, d) macrófagos RAW tratados com a (b, d) Lipofectamina/siRNA-Cy5 e com as formulações de vetores (a) ChD59-Peg/siRNA-Cy5 e (c) RITC/ChD59-Peg/siNT. Os vetores poliméricos foram formulados na razão N/P = 10, em tampão fosfato (pH 7,4; I = 150 mmol L ⁻¹). DAPI = marcador de núcleo.	121
Figura 35 – (a) Expressão de GFP pelas células HeLa-GFP tratadas com as diferentes amostras contendo siGFP livre ou carregado pela Lipofectamina e pelos vetores poliméricos. A expressão de GFP pelas células tratadas com amostras de siNT foi utilizada para normalização dos dados (expressão de GFP = 1,0). (b) Expressão de $\text{TNF}\alpha$ pelos macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e tratados pela Lipofectamina/si $\text{TNF}\alpha$ e pelo vetor ChD59-Peg/si $\text{TNF}\alpha$. Amostras de Lipofectamina e polímero livres (sem si $\text{TNF}\alpha$) foram empregadas como controle. A expressão de $\text{TNF}\alpha$ pelos macrófagos tratados somente com LPS (<i>Cell-LPS</i>) foi utilizada para normalização dos dados (expressão de $\text{TNF}\alpha$ = 1,0). Todos os vetores foram formulados na razão N/P = 20. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado com um nível de significância de 0,05 e foram utilizadas como referência (a) as amostras contendo o siNT e (b) a amostra <i>Cell-LPS</i> . ***p<0,001 e NS= não houve diferenças significativas entre as médias.....	124
Figura 36 - Estudo da interação dos vetores poliméricos com modelo epidermal sintético (Strat M [®]). (a) Esquema ilustrativa da célula de difusão de Franz empregada nos estudos. Concentração de (b) oligo-FAM e de (c) RITC/ChD59-Peg (razão N/P = 20) nos extratos da Strat M [®] acessadas via espectroscopia de fluorescência. Imagens de CLSM representativas de cortes (10 μm) das membranas tratadas com (d) oligo-FAM livre e com (e) RITC/ChD59-Peg/oligo-FAM. Barra de escala: 50 μm	127
Figura 37 - Estudo da interação dos vetores poliméricos com pele de orelha de porco. Imagens de CLSM representativas das amostras de pele tratadas com o (a) excipiente das formulações, (b) oligo-FAM livre e (c) vetores RITC/ChD59-Peg/oligo-FAM (N/P = 20; pH 7,4). (d-f) Imagens de microscopia de campo claro representativas das amostras de pele coradas com H&E. As amostras em (d-f) foram tratadas pelas mesmas formulações descritas em (a-c), respectivamente. Barra de escala: (a-c) 100 μm e (d-f) 200 μm	128
Figura 38 - Estudo da interação dos vetores com a pele do dorso de gerbilos da Mongólia sadios. Imagens de (a-d; f-i) CLSM representativas das amostras de pele tratadas pelos vetores fluorescentes (RITC/ChD59-	

Peg/oligo-FAM). Imagens de (e, j) microscopia de campo claro representativas das amostras em (a-d) e (f-i) coradas com H&E, respectivamente. São apresentadas amostras de pele dos animais (a-e) 01 e (f-j) 02. Barra de escala: (a-d; f-i) 100 μm e (e, j) 200 μm	130
Figura 39 - Imagens de microscopia de campo claro representativas das amostras de pele dos animais dos grupos (a) 01 (vaselina), (b) 02 (IMQ/excipiente) e (c) 03 (IMQ/vetores) coradas com H&E. As imagens à direita são ampliações das regiões destacadas nas imagens à esquerda. Barra de escala: (esquerda) 1 mm e (direita) 200 μm	133
Figura 40 - Imagens de microscopia de campo claro representativas das amostras de pele dos animais dos grupos (a) 01 (vaselina), (b) 02 (IMQ/excipiente) e (c) 03 (IMQ/vetores) coradas com tricrômico de Gomori. As imagens à direita são ampliações das regiões destacadas nas imagens à esquerda. Barra de escala: (esquerda) 500 μm e (direita) 100 μm	134
Figura 41 - Imagens de microscopia de campo claro representativas das amostras de pele dos animais dos grupos (a) 01, (b) 02 e (c) 03 empregadas no ensaio imuno-histoquímico para detecção de $\text{TNF}\alpha$. As imagens à direita são ampliações das regiões destacadas nas imagens à esquerda. Barra de escala: (esquerda) 500 μm e (direita) 100 μm	135
Figura 42 – Fotografias representativas dos animais dos grupos (a) 01, (b) 02 e (c) 03 no dia 08, antes da eutanásia. (d) Expressão de $\text{TNF}\alpha$ na pele dos animais dos diferentes grupos em relação a área total do corte do tecido avaliado (valores obtidos via software ImageJ 1.54f). A análise estatística foi realizada via teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn (nível de confiança de 0,1). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns = sem diferença estatística entre as médias.	136
Figura 43 - Imagens de microscopia de campo claro representativas das amostras de pele dos animais dos grupos (a) 01, (b) 02 e (c) 03 empregadas no ensaio imuno-histoquímico para detecção de F4/80. As imagens à direita são ampliações das regiões destacadas nas imagens à esquerda. Barra de escala: (esquerda) 500 μm e (direita) 100 μm	137

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

$\bar{M}_n$ = massa molar numérica média (unidade: Da)

$\bar{M}_w$ = massa molar ponderal média (unidade: Da)

$\bar{M}_w/\bar{M}_n$ = índice de polidispersão das massas moleculares

ABTS = ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

ABTS $^{\bullet+}$ = radical de ABTS

AuNP = nanopartícula de ouro

AuNP@ChD14-SH = AuNP recoberta com o polímero ChD14-SH

AuNP@ChD33-SH = AuNP recoberta com o polímero ChD33-SH

AuNP@ChD56-SH = AuNP recoberta com o polímero ChD56-SH

AuNP@Ch-SH = AuNP recoberta com o polímero Ch-SH

BCA = ácido bicinconínico

BSA = albumina sérica bovina

Ch = quitosana (não modificada)

ChD14 = quitosana substituída com 14% de DIPEA

ChD14-Peg = ChD14 modificada com PEG

ChD14-SH = ChD14 modificada com grupo tiol

ChD33 = quitosana substituída com 33% de DIPEA

ChD33-Peg = ChD33 modificada com PEG

ChD33-SH = ChD33 modificada com grupo tiol

ChD56 = quitosana substituída com 33% de DIPEA

ChD56-Peg = ChD56 modificada com PEG

ChD56-SH = ChD56 modificada com grupo tiol

Ch-Peg = quitosana modificada com PEG

Ch-SH = quitosana modificada com grupo tiol

Cy5 = cianina 5

D₂O = óxido de deutério

DAB = 3,3'-diaminobenzidina

DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCl = cloreto de deutério

Dh = diâmetro hidrodinâmico (unidade: nm)

DIPEA = diisopropiletilamina

DIPEA-Cl = cloridrato de 2-Cloro-N,N-diisopropiletilamina

DMEM = meio de Eagle modificado por Dulbecco

DTNB = ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EDS = espectroscopia de raios X por energia dispersiva

EDTA = etilenodiamino tetra-acético

ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EtBr = brometo de etídio

FAM = amida de fluoresceína

FBS = soro fetal bovino

FTIR = espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

GA = grau de acetilação obtido via RMN ^1H

GFP = proteína verde fluorescente

GlcN = 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose

GlcNAc = 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose

GPC = cromatografia de permeação em gel

GS_{DIPEA} = grau de substituição por DIPEA

GS_{PEG} = grau de substituição por PEG

GS_{RITC} = grau de substituição por RITC

GS_{SH} = grau de substituição por grupos tiol

H&E = hematoxilina e eosina

I = força iônica (unidade: mol L⁻¹)

IMQ = Imiquimod

LPS = lipopolissacarídeo bacteriano

MEV = microscopia eletrônica de varredura

MM = massa molecular

MM_{mer} = massa molar média dos meros

MTS = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetóxfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

MWCO = corte de peso molecular

NADH = dinucleotídeo de nicotinamida-adenina protonado

NADPH = dinucleotídeo de nicotinamida-adenina-fosfato protonado

NEAA = aminoácidos não essenciais

Oligo-FAM = oligonucleotídeo de DNA marcado com FAM

PBS = tampão fosfato salino pH 7,4

PDI = polidispersividade (em relação ao tamanho das nanopartículas)

pDNA = DNA de plasmídeo

PEG = polietilenoglicol

PEG-SH = O-(2-mercaptoetil)-O-metil-polietileno glicol

PEI = polietilenimina

PES = etossulfato de fenazina

RCF = força centrífuga relativa

RFU = unidade relativa de fluorescência

RISC = complexo de silenciamento induzido por RNA

RITC = isotiocianato de rodamina B

RMN ^{13}C = ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN ^1H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

ROS = espécies reativas de oxigênio

SATP = N-succinimidil S-acetiltiopropionato

SD = desvio padrão

siGFP = siRNA anti-GFP

siTNF α = siRNA anti-TNF α

siNT = siRNA negativo

siRNA = pequeno RNA interferente

siRNA-Cy5 = siRNA marcado com cianina 5

siRNA-FAM = siRNA marcado com amida de fluoresceína

SPDP = N-Succinimidil 3-(2-piriditio)propionato

TNB = 2-nitro-5-tiobenzóico

TNF α = fator de necrose tumoral alfa

α = grau de ionização (unidade: %)

δ = escala delta para deslocamento químico no espectro de RMN (unidade: ppm)

ζ = potencial Zeta (unidade: mV)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. TERAPIA GÊNICA, INTERFERÊNCIA DO RNA E A PSORÍASE	18
1.2. VETORES E AS BARREIRAS BIOLÓGICAS.....	20
1.3. NANOCARREADORES DE siRNA BASEADOS EM QUITOSANA	23
1.4. SÉRIE I: VETORES HÍBRIDOS ESTRUTURADOS COM OURO E QUITOSANA	25
1.5. SÉRIE II: VETORES POLIMÉRICOS ESTRUTURADOS COM QUITOSANA E siRNA.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
3. SÉRIE I: VETORES HÍBRIDOS.....	30
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1.1. <i>Materiais</i>	30
3.1.2. <i>Rota sintética para obtenção dos polications da Série I</i>	31
3.1.2.1. Síntese das quitosanas modificadas com diisopropiletilamina (DIPEA)	31
3.1.2.2. Síntese dos derivados quitosana modificados com grupos tiol (-SH)	32
3.1.3. <i>Caracterização físico-química dos polímeros da Série I</i>	33
3.1.3.1. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	33
3.1.3.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)	33
3.1.3.3. Quantificação dos grupos tiol: teste de Ellman e análise elementar (CHNS)	34
3.1.3.4. Cromatografia de permeação em gel (GPC)	35
3.1.3.5. Grau de ionização em função do pH.....	35
3.1.3.6. Eficiência antioxidante	36
3.1.4. <i>Caracterização físico-química das nanopartículas de ouro (AuNPs) revestidas com os derivados tiolados de quitosana</i>	36
3.1.4.1. Revestimento polimérico	36
3.1.4.2. Medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) das AuNPs: diâmetro hidrodinâmico (Dh) e potencial Zeta (ζ)	37
3.1.4.3. Espectroscopia UV-Vis das AuNPs.....	37
3.1.5. <i>Formulação e caracterização físico-química dos vetores híbridos</i>	38
3.1.5.1. Formulação dos vetores híbridos	38
3.1.5.2. Eletroforese em gel de agarose I: efeitos da razão N/P na eficiência de complexação do siRNA e da presença de proteínas séricas na estabilidade estrutural dos vetores híbridos	38
3.1.5.3. Eletroforese em gel de agarose II: estudo da eficiência de proteção do siRNA contra a degradação por RNase	39
3.1.5.4. Avaliação eficiência de complexação do siRNA via espectroscopia de fluorescência	39
3.1.5.5. Diâmetro hidrodinâmico (Dh), potencial Zeta (ζ) e estabilidade coloidal dos vetores híbridos	40
3.1.5.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das AuNPs e dos vetores híbridos	41
3.1.6. <i>Estudos in vitro</i>	41
3.1.6.1. Culturas celulares	41
3.1.6.2. Avaliação da citotoxicidade dos polímeros e nanoestruturas.....	42
3.1.6.3. Avaliação da internalização celular do siRNA via microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)	43
3.1.6.4. Avaliação da eficiência de transfecção dos vetores híbridos via silenciamento de GFP em células HeLa-GFP.....	43

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO (SÉRIE I)	45
3.2.1. Caracterização físico-química dos polímeros da Série I.....	45
3.2.1.1. Síntese dos DIPEA-derivados de quitosana modificados com grupos tiol (-SH).....	45
3.2.1.2 Espectroscopia de FTIR.....	46
3.2.1.3 RMN ¹ H: determinação do grau de acetilação (GA) e de substituição por DIPEA (GS _{DIPEA}).....	49
3.2.1.4. Quantificação dos grupos tiol: teste de Ellman e análise elementar (CHNS)	51
3.2.1.5. Determinação da massa molecular das DIPEA-quitosanas via cromatografia de permeação em gel (GPC).....	53
3.2.1.6 Grau de ionização (α) dos policátions em função do pH.....	55
3.2.1.7. Avaliação da atividade antioxidante das quitosanas tioladas	57
3.2.2. Caracterização físico-química das nanopartículas de ouro (AuNPs) revestidas com os derivados tiolados de quitosana.....	59
3.2.2.1. Diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e morfologia das AuNPs revestidas em água	59
3.2.2.2. Efeito do pH e da força iônica no diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e estabilidade das AuNPs revestidas	62
3.2.3. Caracterização físico-química dos vetores híbridos	65
3.2.3.1. Efeitos da razão N/P na eficiência de complexação do siRNA.....	65
3.2.3.2 Efeito da razão N/P e do pH no diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e morfologia dos vetores híbridos (AuNP@polímero/siRNA)	67
3.2.3.3 Estabilidade coloidal e biológica dos vetores híbridos (AuNP@polímero/siRNA).....	70
3.2.4 Estudos <i>in vitro</i>	73
3.2.4.1. Avaliação da citotoxicidade dos polímeros, das AuNPs e dos vetores híbridos	73
3.2.4.2. Avaliação da internalização celular do siRNA via microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)	76
3.2.4.3. Avaliação da eficiência de transfecção dos vetores híbridos via silenciamento de GFP em células HeLa-GFP.....	78
4. SÉRIE II: VETORES POLIMÉRICOS	80
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS	80
4.1.1. Materiais.....	80
4.1.2. Rota sintética para obtenção dos policátions da Série II	81
4.1.2.1. Reação de enxertia de polietileno glicol (PEG) nas DIPEA-quitosanas	81
4.1.2.2. Reação de marcação dos policátions com isotiocianato de rodamina B (RITC).....	82
4.1.3. Caracterização físico-química dos polímeros da Série II	83
4.1.3.1. Espectroscopias de absorção na região do infravermelho (FTIR) e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	83
4.1.3.2. Determinação do grau de substituição por rodamina (GS _{RITC}) via espectroscopia de absorção na região UV-Vis	83
4.1.3.3. Cromatografia de permeação em gel (GPC)	84
4.1.3.4. Potencial Zeta (ζ) dos polímeros em função do pH.....	84
4.1.3.5. Captação de prótons (H ⁺) em função do pH	84
4.1.3.6. Eficiência antioxidante	85
4.1.3.7. Estudo da biodegradação enzimática (lisozima) dos policátions por viscosimetria	85
4.1.3.8. Liberação do PEG-SH em ambiente redutor.....	86
4.1.4. Formulação e caracterização físico-química dos vetores poliméricos	87
4.1.4.1. Formulação dos vetores poliméricos	87
4.1.4.2. Eletroforese em gel de agarose I: avaliação dos efeitos da razão N/P e da presença de proteínas séricas na estabilidade estrutural dos vetores poliméricos	87

4.1.4.3. Eletroforese em gel de agarose II: estudo da eficiência de proteção do siRNA contra a degradação por RNase e por espécies reativas de oxigênio (ROS)	88
4.1.4.4. Eletroforese em gel de agarose III: estudo da influência da biodegradação dos polímeros na complexação do siRNA.....	89
4.1.4.5. Diâmetro hidrodinâmico (Dh), potencial Zeta (ζ) e estabilidade coloidal dos vetores poliméricos.....	89
4.1.4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos vetores poliméricos.....	90
4.1.5. <i>Estudos in vitro</i>	90
4.1.5.1. Culturas celulares	90
4.1.5.2. Avaliação da citotoxicidade dos polímeros e vetores poliméricos.....	90
4.1.5.3. Avaliação da internalização celular do siRNA via microscopia confocal (CLSM)	91
4.1.5.4. Estudo de transfecção via silenciamento de GFP em células HeLa-GFP	91
4.1.5.5. Estudo de transfecção via silenciamento de TNF α macrófagos RAW	92
4.1.6. <i>Estudos de permeação in vitro</i>	93
4.1.6.1. Avaliação da adesão dos vetores poliméricos em modelo de pele artificial (Strat M [®]).....	93
4.1.6.2. Preparação da pele de orelha de porco.....	94
4.1.6.3. Avaliação da interação dos vetores com a pele de orelha de porco	94
4.1.7. <i>Estudos in vivo</i>	95
4.1.7.1. Animais	95
4.1.7.2. Aplicação tópica de nanopartículas fluorescentes em gerbilos da Mongólia sadios	95
4.1.7.3. Indução de inflamação semelhante a psoríase em gerbilos da Mongólia via aplicação de Imiquimod (IMQ) e tratamento via uso tópico dos vetores carregados com siTNF α	96
4.1.7.4. Avaliação morfológica e imuno-histoquímica da pele dos animais com psoríase induzida.....	97
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO (SÉRIE II)	98
4.2.1. <i>Caracterização físico-química dos polímeros da Série II</i>	98
4.2.1.1. Síntese das DIPEA-quitosana modificados com polietilenoglicol (PEG).....	98
4.2.1.2. Espectroscopia de FTIR e RMN ¹ H: determinação do grau de PEGuilação (GS _{PEG})	99
4.2.1.3. Espectroscopia UV-Vis: determinação do grau de substituição por RITC (GS _{RITC}).....	100
4.2.1.4. Determinação da massa molecular dos derivados de quitosanas via cromatografia de permeação em gel (GPC)	103
4.2.1.5. Capacidade de captura de prótons (H ⁺) e potencial Zeta (ζ) dos polímeros em função do pH	104
4.2.1.6. Avaliação da atividade antioxidante das quitosanas PEGuiladas.....	107
4.2.1.7. Avaliação da biodegradação enzimática dos polications por viscosimetria	107
4.2.1.8. Estudo da liberação do PEG-SH em ambiente redutor	109
4.2.2. <i>Caracterização físico-química dos vetores poliméricos</i>	111
4.2.2.1. Efeitos da razão N/P na eficiência de encapsulamento do siRNA e no potencial Zeta (ζ) e diâmetro hidrodinâmico dos vetores.....	111
4.2.2.2. Morfologia dos vetores poliméricos	112
4.2.2.3. Estabilidade estrutural e coloidal dos vetores poliméricos	113
4.2.2.4. Avaliação da proteção do siRNA contra o ataque de RNase e o estresse oxidativo	115
4.2.2.5. Efeito da degradação do polication na liberação do siRNA.....	117
4.2.3. <i>Estudos in vitro</i>	119
4.2.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos polímeros e vetores da Série II.....	119
4.2.3.2. Avaliação da internalização celular do siRNA via microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)	119
4.2.3.3. Estudo de transfecção via silenciamento de GFP em células HeLa-GFP	122
4.2.3.4. Estudo de transfecção via silenciamento de TNF α em macrófagos RAW	122

4.2.4. Estudos de permeação dos vetores poliméricos <i>in vitro</i>	125
4.2.4.1. Adesão dos vetores poliméricos em modelo de pele artificial (Strat M®).....	125
4.2.4.2. Avaliação da permeação dos vetores poliméricos em pele de orelha de porco	126
4.2.5. Estudos <i>in vivo</i>	129
4.2.5.1. Avaliação da permeação dos vetores poliméricos na pele de gerbilos da Mongólia sadios.....	129
4.2.5.2. Aplicação dos vetores poliméricos carregados com siTNF α no tratamento de inflamação semelhante a psoríase em gerbilos da Mongólia	131
5 CONCLUSÃO	138
REFERÊNCIAS	140
APÊNDICES	158
APÊNDICE A – Massa molar média das unidades formadoras dos polímeros (m_{mer}): Séries I e II.....	158
APÊNDICE B – Teste de Ellman e análise elementar (CHNS): Série I	159
APÊNDICE C – Titulações potenciométricas e condutométricas: Série I e II.....	160
APÊNDICE D – Ensaio antioxidante com ABTS: Série I.....	162
APÊNDICE E – Dados adicionais de DLS e MEV-FEG das AuNP@polímeros Série I.....	163
APÊNDICE F – Dados adicionais de eletroforese e DLS dos vetores híbridos: Série I.....	166
APÊNDICE G – Dados e informações adicionais dos estudos <i>in vitro</i> : Série I.....	169
APÊNDICE H – RMN 1H	172
APÊNDICE I – Dados adicionais de eletroforese, DLS e MEV dos vetores poliméricos: Série II	176
Apêndice J – Reação de Fenton: monitoramento da eficiência de produção de radicais $\bullet OH$ na presença dos derivados de quitosana.....	180
APÊNDICE K – Dados e informações adicionais dos estudos <i>in vitro</i> : Série II.....	182
APÊNDICE L – Dados e informações adicionais dos estudos de permeação <i>in vitro</i> : Série II.....	184
APÊNDICE M – Dados e informações adicionais dos estudos <i>in vivo</i> em gerbilos da Mongólia sadios tratados com as formulações de vetores poliméricos contendo grupos fluoróforos: Série II	185
APÊNDICE N – Dados e informações adicionais dos estudos <i>in vivo</i> em gerbilos da Mongólia com psoríase induzida via aplicação de Imiquimod: Série II.....	188
ANEXOS	196
ANEXO A – Patente depositada	196
ANEXO B – Artigos publicados.....	197
ANEXO C – Publicações em anais de congresso	200

1. INTRODUÇÃO

1.1. TERAPIA GÊNICA, INTERFERÊNCIA DO RNA E A PSORÍASE

O tratamento de doenças por meio da inserção de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) em células específicas de um paciente é uma das modalidades da terapia gênica (STAFF, 2001), na qual, geralmente, utilizam-se veículos denominados vetores para inserir o material genético nas células alvo (**Figura 1a**). Em 1989, foi realizado o primeiro ensaio clínico envolvendo a terapia gênica que apresentou um relativo sucesso e, no início dos anos 2000, começaram a ser aprovados para comercialização os primeiros medicamentos baseados em ácidos nucleicos, com perspectiva de aprovação de 10 novos produtos do gênero até 2025 (ARABI; MANSOURI; AHMADBEIGI, 2022). Até março de 2022, somente no Brasil, três produtos associados à terapia gênica encontravam-se aprovados para uso comercial (Zolgensma, Luxturna e Kymriah) e mais sete estavam sendo estudados em ensaios clínicos (CORNETTA et al., 2022). O potencial desta terapia também é destacado pelo aumento de mais de 300% no número de ensaios clínicos envolvidos no tema, de 2010 a 2020. Esse impulso foi ainda mais proeminente nos dois últimos anos, com o uso dessa tecnologia terapêutica para produção de vacinas de RNA mensageiro (RNAm) no combate à pandemia de COVID-19 (ARABI; MANSOURI; AHMADBEIGI, 2022).

Tendo sempre uma finalidade terapêutica, a terapia gênica procura modificar/manipular a expressão de um gene para alterar as propriedades biológicas de células vivas (SHERKOW; ZETTLER; GREELY, 2018). Uma das formas de se fazer isso é utilizando o mecanismo conhecido como interferência do RNA (RNAi), no qual RNAs de fita dupla (dsRNA) levam à degradação do RNAm transcrito por um gene específico (MIRZAEI et al., 2021) e, assim, o produto da expressão desse gene não é obtido (**Figura 1b**). Dentre os dsRNAs, o pequeno RNA de interferência (siRNA) tem um papel de destaque por apresentar 19-23 pares de bases (com mais 2 nucleotídeos salientes na terminação 3'), o que possibilita sua pronta associação com o complexo silenciador induzido por RNA (RISC) para clivagem do RNAm (DEVI, 2006). Neste processo, as fitas duplas do siRNA são separadas e a fita antisenso serve como guia para o RISC localizar e clivar RNAm alvo (complementar a fita), que é descartado, deixando o RISC livre. Assim, uma única molécula de siRNA pode direcionar a destruição de várias moléculas de RNAm (PREALL; SONTHEIMER, 2005).

Nos últimos anos, a exploração do potencial dos ácidos nucleicos para o tratamento de diferentes doenças resultou no surgimento de vários medicamentos do gênero (GINN et al., 2018)

e, em particular, na primeira droga baseada em RNAi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*), conhecida comercialmente como Onpattro™ (patisiran). O patisiran, desenvolvido pela Alnylam Pharmaceuticals, consiste em um siRNA encapsulado em uma nanopartícula lipídica (direcionada aos hepatócitos) que tem como alvo o RNAm para síntese da transtirretina, visando o tratamento da amiloidose hereditária (HOY, 2018; RIZK; TÜZMEN, 2019). Neste cenário, o crescente número de tecnologias promissoras baseadas em vetores não virais e no princípio RNAi tem atraído cada vez mais a atenção da indústria farmacêutica, que tem atuado continuamente no desenvolvimento de nanoplataformas direcionadas para o tratamento de diversas desordens, como carcinomas, infecções, doenças hepáticas e cardiovasculares (HERRERA et al., 2018). Em particular, destacam-se as doenças inflamatórias, nas quais a administração de siRNAs direcionados a citocinas associadas à progressão do quadro inflamatório tem demonstrado grande potencial terapêutico (PANDI et al., 2017; TRAN; AMIJI, 2015).

A psoríase é uma doença inflamatória crônica que se manifesta na pele e/ou articulações dos pacientes e afeta até 3% da população mundial, envolvendo custos anuais na ordem de 25 mil dólares por paciente (BREZINSKI; DHILLON; ARMSTRONG, 2015). Acredita-se que a imunopatogênese da psoríase resulta de uma interação complexa entre células T, células dendríticas e queratinócitos, gerando o processo inflamatório na pele, que é caracterizado pela hiperproliferação acentuada de queratinócitos, infiltração de células imunes e remodelação vascular na pele (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015). Em casos graves, essa doença pode ser tratada por meio de anticorpos monoclonais (Adalimumabe, Secuquinumabe, Ustekinumab, entre outros) que têm como alvo citocinas que desempenham um papel central no seu desenvolvimento, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e as interleucinas (17 e 23). Além do alto custo, a predisposição para o surgimento de infecções e desordens de natureza neurológicas também são alguns dos aspectos negativos associados ao uso desses agentes terapêuticos (PANDI et al., 2017). Nesse sentido, terapias baseadas em RNAi têm demonstrado potencial para tratar a psoríase tendo como alvo o TNF α (MAREPALLY et al., 2014) e outras citocinas/proteínas pró-psoriáticas (DEPIERI et al., 2016; DESMET et al., 2018; MAREPALLY et al., 2014).

Além de seus efeitos pró-inflamatórios, o TNF α induz a liberação de outras citocinas que podem potencializar o quadro psoriático (BOEHNCKE; SCHÖN, 2015). Devido ao seu papel central na inflamação, neste estudo, buscou-se desenvolver vetores não virais que possibilitassem a redução da expressão do TNF α em modelos *in vitro* e *in vivo* de psoríase induzida, por meio da entrega eficiente de siRNA nos tecidos e células-alvo.

1.2. VETORES E AS BARREIRAS BIOLÓGICAS

Ao longo da última década, os avanços na engenharia do RNA têm possibilitado a obtenção de siRNAs com atividade farmacológica melhorada, fato que impulsionou o interesse da comunidade científica sobre estas moléculas, visando o estabelecimento de plataformas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças (HU et al., 2020). Apesar das melhorias, a eficiência terapêutica do siRNA ainda é limitada pelo uso de vetores capazes de direcioná-los até o seu local de ação, no interior das células alvo (DE BRITO E CUNHA et al., 2022). Quando os ácidos nucleicos são aplicados diretamente sobre as células (*in vitro*), dificilmente eles são internalizados, devido as suas dimensões, carga negativa (repulsão com a membrana plasmática) e hidrofobicidade, sem considerar a alta possibilidade de degradação pelas nucleases presente no meio. Ainda, quando se emprega o siRNA livre em sistemas mais complexos (*in vivo*), existem outros fatores (dependentes da via de aplicação empregada) que limitam sua eficiência terapêutica, como a depuração renal, a permeação através dos tecidos e a ativação do sistema imune (SAJID et al., 2020). Nesse sentido, os vetores emergem como agentes voltados para a superação destas barreiras, maximizando a eficiência das terapias baseadas na RNAi (**Figura 1c**).

De forma abrangente, os vetores podem ser classificados em virais e não virais, sendo que os vetores baseados em vírus foram os mais amplamente estudados e, conseqüentemente, originaram os primeiros medicamentos voltados para terapia gênica (ARABI; MANSOURI; AHMADBEIGI, 2022). Porém, os menores custos de produção, a maior segurança e a considerável escalabilidade atraíram a atenção do setor farmacêutico para os vetores não virais, sobretudo após a aplicação de vetores lipossomais (não virais) na constituição de algumas das principais vacinas contra COVID-19. Aqui, vale mencionar que os vetores não virais ainda podem ser classificados quanto à sua composição (poliplexos, lipoplexos, nanopartículas inorgânicas e outros), porém, neste estudo o foco será dado aos poliplexos, vetores formados a partir da complexação dos ácidos nucleicos por polímeros catiônicos (GANTENBEIN et al., 2020).

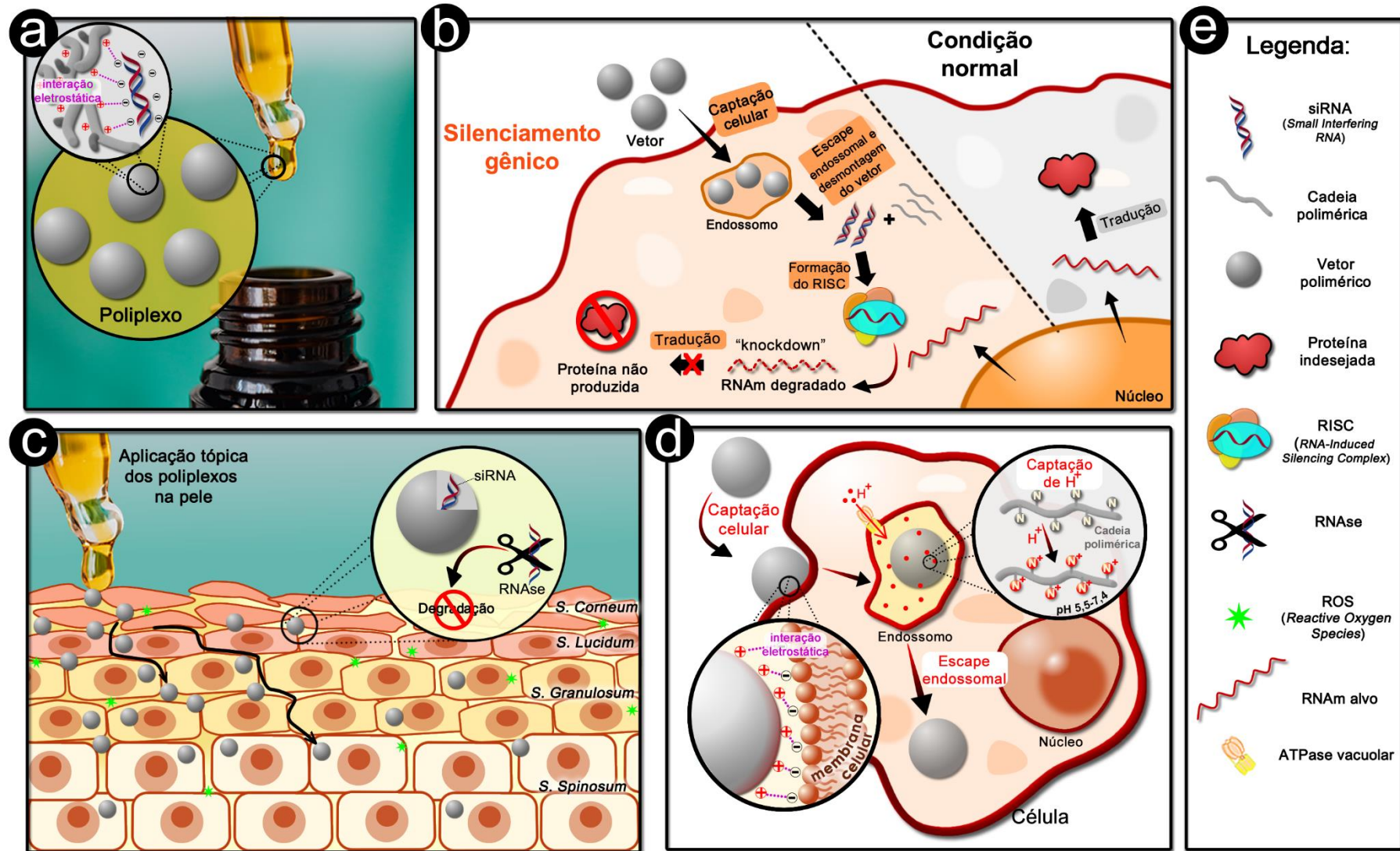
A partir do apresentado até o momento, pode-se inferir que a construção de vetores para terapia gênica é uma tarefa complexa. De fato, somente vetores multifuncionais serão capazes de superar a maioria as barreiras associadas à administração terapêutica do siRNA, que se iniciam na encapsulação do ácido nucleico pelo transportador e seguem até a sua liberação no citosol das células alvo (ZHOU et al., 2016).

A complexação dos ácidos pelos polícatíons, além de oferecer certa proteção contra o ataque de nucleases, também criam (sob as condições e proporções adequadas) nanoestruturas com carga

superficial positiva, o que praticamente extingue a repulsão eletrostática entre o DNA/RNA e as membranas celulares, carregadas negativamente (ZU; GAO, 2021). Uma vez em contato com a células, estas nanopartículas podem ser internalizadas. A endocitose é uma das principais vias de internalização dos poliplexos, cujo destino no interior da célula depende do tipo de célula alvo e das características físico-químicas do nanocarreador, porém, na maioria dos casos, os poliplexos seguem vias ácidas que culminam na degradação lisossomal do material endocitado (AGIRRE et al., 2014; DOWDY, 2017). Neste ponto, os vetores não virais formados por polímeros sensíveis ao pH ganham destaque, pois podem escapar da degradação por meio de um mecanismo chamado de esponja de prótons (**Figura 1d**), que é baseado no aumento combinado da carga superficial dos vetores, devidos a protonação das cadeias poliméricas, e da pressão osmótica no interior do endossomo (CABRAL et al., 2018). Desta forma, o siRNA pode atingir o citosol da célula alvo.

Nas aplicações *in vivo*, as dimensões dos vetores também exercem grande influência na sua distribuição pelo organismo. Enquanto nanopartículas inferiores a 5 nm sofrem uma rápida depuração renal, estruturas maiores que 200 nm são eliminadas pelo baço e filtração do fígado. Embora seja complicado definir uma faixa tamanho ótima, em geral, nanocarreadores com dimensões entre 20 e 200 nm têm apresentado uma boa eficiência no transporte de ácido nucleicos (MIRZAEI et al., 2021; ZU; GAO, 2021). Ainda, a permeação através dos tecidos também se mostrou dependente da dimensão do material, de modo que nanopartículas com diâmetros próximos à 20 nm se mostraram mais eficientes em transpor a pele do que nanopartículas com tamanhos próximos à 200 nm, por exemplo (RAJU et al., 2018). Neste ponto, vale ressaltar que, embora a pele seja uma barreira difícil de ser superada, a literatura aponta para bons níveis de permeação de fármacos após a aplicação tópica de medicamentos nanoestruturados voltado para o tratamento da psoríase (ROSA et al., 2018). Experimentos em modelos *in vivo* de psoríase utilizando tanto lipoplexos quanto dendriplexos (vetores baseados em lipídeos e dendrímeros, respectivamente) foram igualmente eficazes na administração tópica de siRNA direcionado ao TNF α (PANDI et al., 2018), assim como terapias de RNAi baseadas em nanopartículas formuladas com amido quaternizado (ZIMON et al., 2018), sistemas híbridos ouro-siRNA (NEMATİ et al., 2017) e outros carreadores/estratégias (ROSA et al., 2018).

Figura 1 – (a) Vetor polimérico aplicado no transporte do siRNA com (b) esquema ilustrativo do seu mecanismo de ação. Ilustração da capacidade dos vetores em (c) proteger o siRNA da degradação por nuclease, facilitar sua permeação epidérmica e (d) favorecer seu escape endossomal. (e) Legenda.



Fonte: elaborado pelo autor.

Adicionalmente, vale mencionar que nas aplicações *in vivo*, a mesma carga superficial que possibilita a internalização dos poliplexos, também favorece a ocorrência de interações indesejadas com proteínas e outros constituintes biológicos, levando à destruição ou alteração das propriedades físico-químicas do vetor. Visando minimizar essas interações, os poliplexos são frequentemente revestidos com polietilenoglicol (PEG), um polímero hidrofílico não catiônico que, além do efeito estérico, cria uma camada de hidratação ao redor do vetor, o que favorece a manutenção de sua integridade estrutural (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; SAJID et al., 2020).

1.3. NANOCARREADORES DE siRNA BASEADOS EM QUITOSANA

Em 1995, a quitosana foi utilizada pela primeira vez no transporte de ácidos nucleicos e, devido a sua baixa citotoxicidade, alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo, ela tem sido um dos polímeros mais estudados para terapia gênica (CAO et al., 2019; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016). Estudos recentes mostraram que nanopartículas de siRNA/quitosana são potenciais candidatos para o tratamento de várias doenças, por exemplo: infecção por HIV (MOBARAKEH et al., 2019), câncer de mama (LIANG et al., 2021), tuberculose (KOLI et al., 2019) e doença de Huntington (SAVA et al., 2020).

Estruturalmente, a quitosana é definida como um copolímero formado por 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN) e 2-acetoamino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) unidos por ligações $\beta_{1\rightarrow4}$ e, embora a proporção entre ambas as unidades (GlcN e GlcNAc) seja variável, há a predominância da unidade GlcN em sua estrutura (HEJAZI; AMIJI, 2001). As aminas primárias presentes nas unidades GlcN conferem à quitosana o seu caráter catiônico e possibilitam a sua interação com os ácidos nucleicos, aplicação que é limitada a ambientes ácidos devido ao seu baixo valor de pKa - próximo a 6,5 (CAO et al., 2019). Assim, os vetores baseados em quitosana (não modificada) apresentam uma baixa eficiência em ambientes com valores de pH neutro/básico, como no sangue (pH 7,4), olhos (pH 7,8) e jejuno (pH 7-8), por exemplo (MORARU et al., 2020; PATHOMTHONGTAWEECHAI; MUANPRASAT, 2021; ZAMBOULIS et al., 2020). Visando superar essa limitação, a quitosana tem sido modificada com grupos químicos que apresentam aminas secundárias/terciárias em sua estrutura, como a poli-L-lisina (PLL), a polietilenimina (PEI) e o dietilaminoetil (DEAE), os quais, devido aos maiores valores de pKa, têm resultado na formação de nanocarreadores de siRNA mais estáveis em pH sanguíneo (MARTINS et al., 2019; NAM; NAH, 2016; ZHANG et al., 2016a). Em particular, destaca-se os grupos hidrofóbicos

ionizáveis, como o diisopropiletilamina (DIPEA), um análogo estrutural do DEAE, que têm demonstrado uma alta sensibilidade ao pH (ZHOU et al., 2012) e aprimorado a capacidade dos polímeros em atuarem como agentes para terapia gênica (ZHOU et al., 2016). Além disso, o DIPEA está presente na estrutura de vários medicamentos disponíveis comercialmente (disopirâmida, propantelina e acetimidina, por exemplo), assim, espera-se que sua associação com a quitosana gere derivados com características biocompatíveis.

Em adição às modificações químicas, o grau de acetilação (GA) e a massa molecular (MM) da quitosana são parâmetros que têm demonstrado uma grande influência na eficiência de transfecção dos seus vetores (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016). A literatura aponta que quitosanas com alta MM são preferíveis em relação as de MM menores (< 50 kDa), devido a maior estabilidade dos vetores e a proteção aprimorada nos compartimentos endolisossomais (CAO et al., 2019). Contudo, a seleção da MM deve ser cuidadosa, pois MMs muito elevadas podem restringir a liberação dos ácidos nucleicos, diminuindo a eficiência de transfecção (LAYEK; SINGH, 2017). Um baixo GA se traduz em mais grupos amina na cadeia da quitosana, os quais são essenciais para complexação dos ácidos nucleicos (CAO et al., 2019). Para os nanocarreadores de siRNA formulados em meio ácido ($\text{pH} < 6,5$), a literatura tem apontado que, quanto menor o valor de GA da quitosana, maior a eficiência de transfecção dos seus vetores (ALAMEH et al., 2018). Contudo, recentemente foi demonstrado que o GA próximo à 25% têm um caráter primordial na estabilização dos vetores em $\text{pH} 7,4$, possibilitando com que DEAE-quitosanas (MM de 200 kDa) formem nanocarreadores de siRNA (100-200 nm de diâmetro) estáveis em $\text{pH} 7,4$ (MARTINS et al., 2019).

Considerando uma aplicação voltada ao tratamento da psoríase, vale mencionar que, nos últimos anos, houve um crescente interesse no uso de formulações baseadas em quitosana para aplicações tópicas. Por exemplo, nanopartículas de quitosana associadas ao tripolifosfato (TPP) têm sido utilizadas para geração de promissores sistemas para entrega transdérmica de pDNA (ÖZBAŞ-TURAN; AKBUĞA, 2011), propranolol (AL-KASSAS et al., 2016) e curcumina (ABDEL-HAFEZ; HATHOUT; SAMMOUR, 2018). Resultados igualmente relevantes também foram obtidos ao se utilizar a quitosana e seus derivados no transporte transdérmico de melatonina (HAFNER et al., 2011), insulina (VENUGOPAL; JAYACHANDRAN, 2012) e lidocaína (ENGKAGUL et al., 2017). Nesse quesito, os grupos amina também desempenham um papel central pois, a carga superficial da quitosana afeta sua capacidade de carrear fármacos através dos tecidos (SCHIPPER et al., 1997) devido as interações de natureza eletrostática que ocorrem entre os polímeros e as proteínas de junção e/ou membranas celulares (ERMAN; VERANIČ, 2018).

Desta forma, neste estudo, quitosanas parcialmente acetiladas de alta massa molecular (≥ 700 kDa) foram modificadas com DIPEA para geração de nanocarreadores de siRNA voltados para o tratamento da psoríase, via aplicação tópica. Para tal, foram propostas duas estratégias, as quais originaram duas séries de nanocarreadores, descritas a seguir.

1.4. SÉRIE I: VETORES HÍBRIDOS ESTRUTURADOS COM OURO E QUITOSANA

Nanopartículas híbridas ouro-siRNA também vêm sendo utilizadas para transpor o estrato córneo e experimentos *in vivo* mostraram que a aplicação tópica de siRNAs via nanopartículas de ouro melhoraram significativamente as lesões cutâneas semelhantes à psoríase (NEMATİ et al., 2017). Neste contexto, a primeira estratégia (Série I) baseou-se na aplicação das DIPEA-quitosanas para revestir nanopartículas de ouro (AuNP), que foram aplicadas na formulação dos vetores híbridos (**Figura 2**). Nesta série, as AuNPs atuaram como uma base para construção dos nanovetores, assim, o emprego de AuNPs com dimensões apropriados (20-30 nm) foi de fundamental importância para criação de vetores eficientes (RAJU et al., 2018)

O controle da carga superficial dos nanovetores, por meio de ajustes no conteúdo de policação/DIPEA das AuNPs, também apresentou caráter primordial nesta série, uma vez que AuNPs (15 nm) carregadas positivamente são mais eficientes (2-6 vezes) em penetrar as camadas da pele e serem internalizadas pelas células em comparação à AuNPs negativamente carregadas (FERNANDES et al., 2015). Nesse sentido, vários polications têm sido incorporados à nanopartículas de ouro, a fim de ampliar seu potencial para carrear fármacos através dos tecidos e entregá-los no interior das células-alvo. Nanopartículas de ouro (5-10 nm) funcionalizadas com PEG/oleilamina foram capazes de penetrar o estrato córneo e se depositar nas camadas mais internas da pele (HSIAO et al., 2019). Também foi relatado que AuNPs (20 nm) recobertas com Poli-L-lisina formularam vetores híbridos (50 nm) aplicados no transporte de siRNA que apresentaram alta eficiência de transfecção e capacidade de acumulação em tumores subcutâneos (KIM et al., 2014). Quando revestidas com quitosana, observou-se que as AuNPs (10 nm) foram internalizadas muito mais rapidamente (12 vezes) pelas células do que nanoestruturas com potencial Zeta negativo (BOYLES et al., 2015) e, além disso, ao serem aplicadas *in vivo* (oralmente), foram absorvidas em uma taxa muito maior (25 vezes) do que AuNPs revestidas somente com PEG (ALALAIWE et al., 2019). De fato, o revestimento de nanopartículas metálicas

com quitosana tem despertado o interesse do setor industrial, como é o caso da NANOBAND (Montreal, Canada), que desde 2018 vem explorando o potencial biotecnológico destas nanoplateformas (NANOBAND, 2022).

Os grupos tiol são frequentemente utilizados para ancorar fármacos e outros compostos na superfície de AuNPs por meio da formação de ligações covalentes ouro- enxofre (**Figura 2b**). Contudo, essas ligações podem ser facilmente deslocadas por outras moléculas contendo grupos tiol livres (HERMANSON, 2013). Nesse sentido, foi demonstrado que a glutathione reduzida, presente em altas concentrações no interior celular (TIERA et al., 2013), tem a capacidade de promover a liberação dos polícatoms e siRNAs das AuNPs ao fornecer novos grupos -SH para substituir suas ligações (KIM et al., 2014), o que contribui para tornar a liberação intracelular do siRNA mais eficiente (**Figura 2c**). Desta forma, os polícatoms da Série I também foram modificados com uma baixa densidade de grupos tiol visando o ancoramento das DIPEA- quitosanas na superfície das AuNPs.

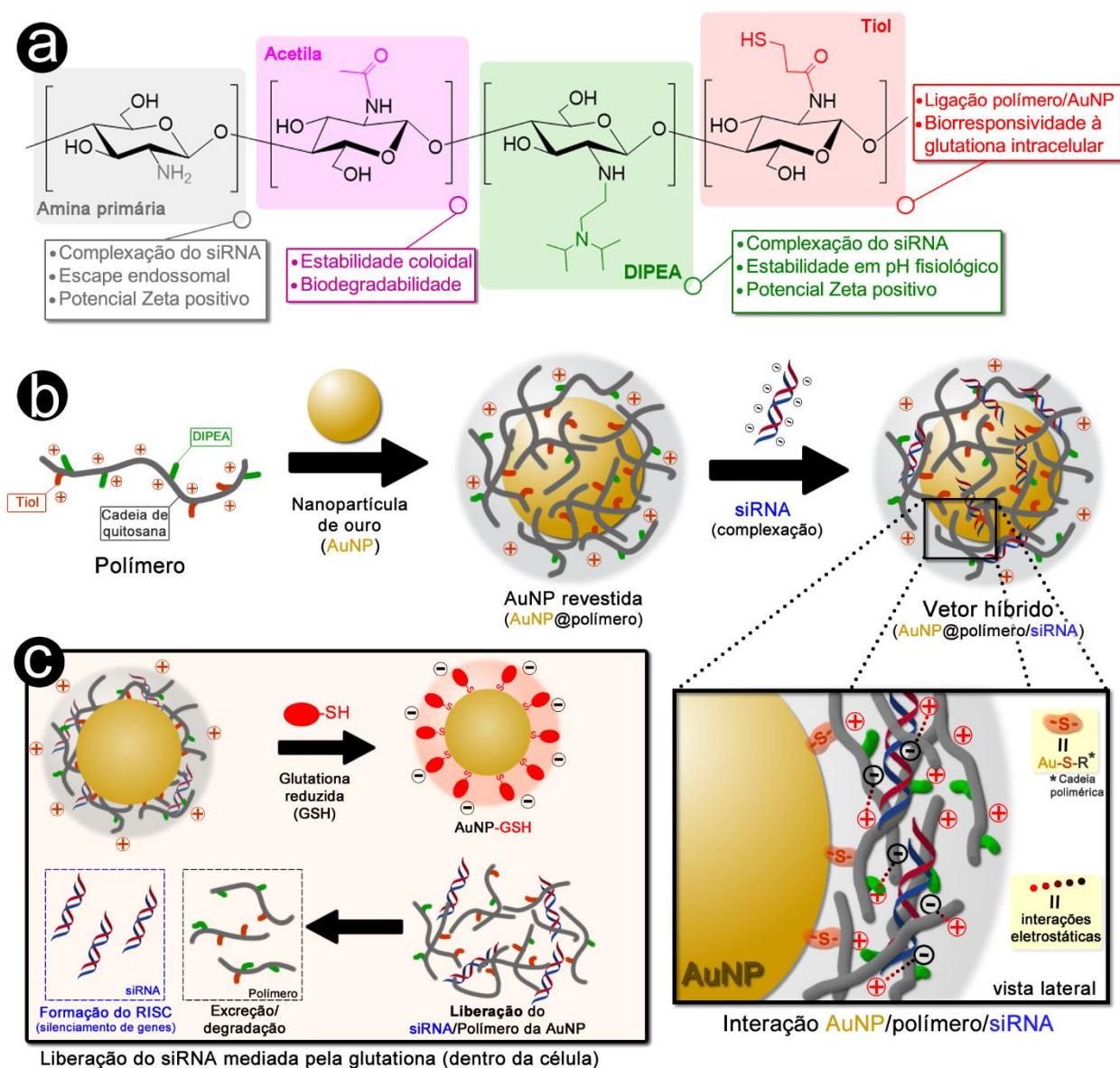
1.5. SÉRIE II: VETORES POLIMÉRICOS ESTRUTURADOS COM QUITOSANA E siRNA

A segunda estratégia (Série II) consistiu na formulação de vetores poliméricos (poliplexos) por meio da simples complexação do siRNA pelos DIPEA-derivados de quitosana. Visando aumentar o potencial de aplicação desses vetores *in vivo*, os polícatoms da Série II também foram modificados com PEG via ligação dissulfeto (**Figura 3**) com intuito de favorecer a estabilidade estrutural dos vetores ao minimizar as interações destrutivas com constituintes biológicos (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015). De fato, foi relatado que o enxerto (1,5%) de PEG de 5 kDa na quitosana ampliou sua capacidade de carrear siRNA para dentro das células-alvo, possibilitando altos níveis de silenciamento genético (YANG et al., 2017a).

O PEG é um polímero não biodegradável, assim sua rápida eliminação do organismo é almeável, com o intuito de efeitos de exposição à longo prazo (CABRAL et al., 2018). O uso de ligações dissulfeto para ancorar o PEG à quitosana pode ser uma boa estratégia para promover a sua liberação do nanocarreador, mediante ação da glutathione reduzida (GSH). Uma vez clivada a ligação dissulfeto, o PEG é liberado do polícatom e pode ser facilmente eliminado pelos rins, se sua MM for inferior à 60 kDa (CABRAL et al., 2018). Além disso, a eliminação do revestimento de PEG pode facilitar a interação do vetor com a membrana endossomal interna (**Figura 3c**),

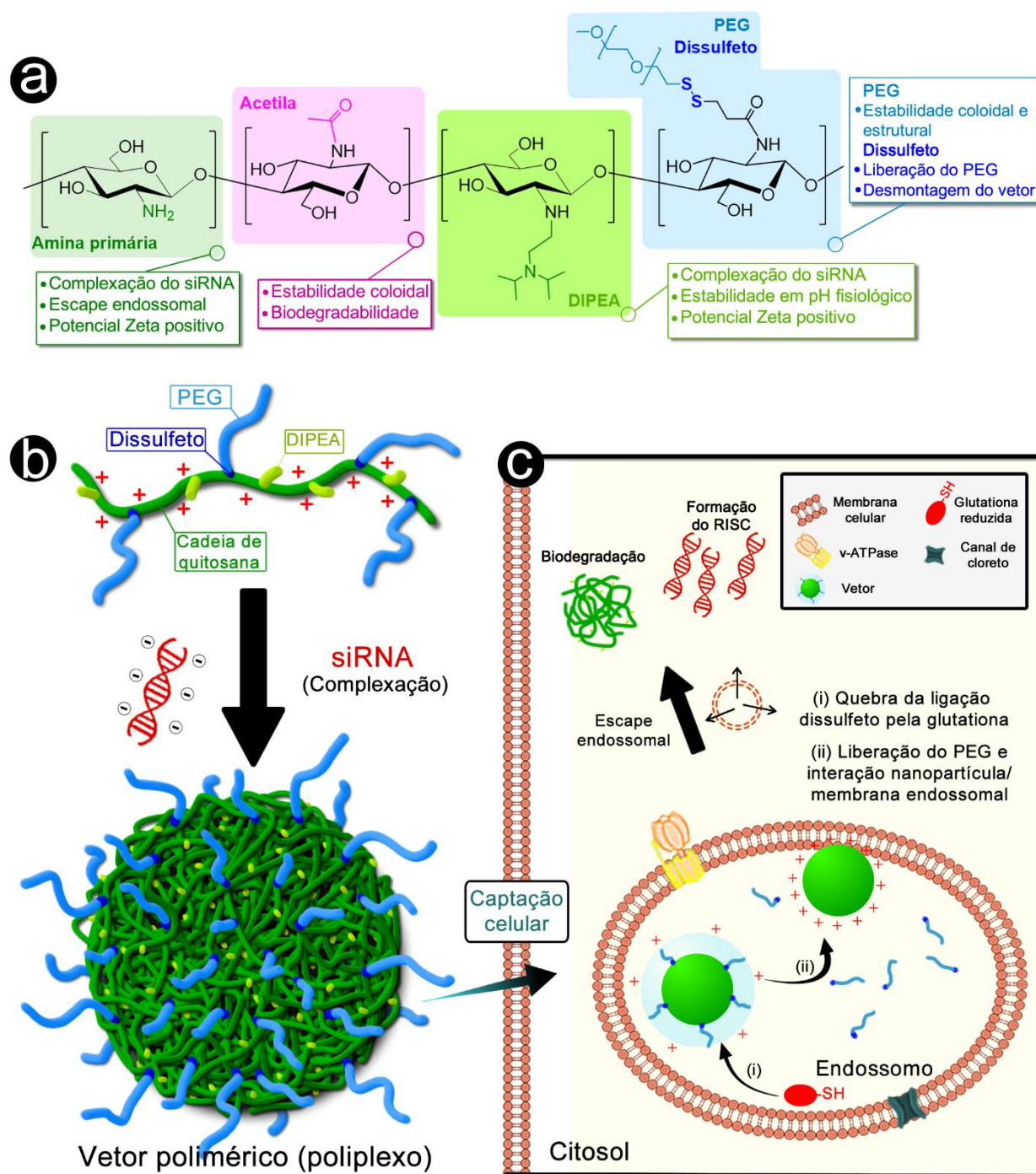
essencial para promover o escape endossomal (SAJID et al., 2020; TAMURA; YUI, 2014). Por fim, vale mencionar que, como o PEG é a estrutura mais externa das nanopartículas, ele também pode ser quimicamente modificado para tornar o vetor mais seletivo à determinados alvos biológicos (ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

Figura 2 - (a) Estrutura química dos polícatíons da Série I, com indicação das principais funções de cada mero. **(b)** Formação do vetor híbrido estruturado com ouro e DIPEA-quitosana e **(c)** esquema da desmontagem intracelular do nanocarreador em resposta glutatona reduzida.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 3 - (a) Estrutura química dos policátions da Série II, com indicação das principais funções de cada mero. **(b)** Formação do vetor polimérico pela simples complexação do siRNA pelo policátion e **(c)** escape endossomal responsivo à glutatona.



Fonte: elaborado pelo autor.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram desenvolvidos nanocarreadores de siRNA baseados em DIPEA-quitosanas de alta massa molecular. Duas séries de nanocarreadores foram desenvolvidas. Na **Série I**, as DIPEA-quitosanas foram modificadas com grupos tiol e ancorados na superfície de nanopartículas de ouro (AuNPs) e, então, as nanopartículas híbridas foram empregadas no transporte do siRNA. Na **Série II** as quitosanas foram modificadas com PEG-SH e empregadas na formulação dos vetores pelo método de cross-linking iônico. Em ambas as séries, os polycations complexaram eficientemente o siRNA em baixas razões N/P (2 a 10) formando nanoestruturas de carga superficial positiva (+8 a +12 mV), diâmetros entre 100-200 nm, boa estabilidade coloidal e elevada resistência a desmontagem induzida por interações inespecíficas com proteínas séricas (albumina), resultados observados em uma **ampla faixa de pH** (pH 5,5 a 7,4) em força iônica de 150 mmol L⁻¹. Os vetores da Série II forneceram **proteção** ao siRNA contra o estresse oxidativo e o ataque de RNase, além de serem passíveis de **biodegradação** mediada pela lisozima e serem capazes de **liberar o PEG-SH** em ambiente redutor, constituindo possíveis vias de liberação dos siRNA por meio de estímulos intracelulares. As propriedades físico-químicas dos nanocarreadores (estabilidade, tamanho, carga superficial e outros) e, conseqüentemente, suas **eficiências de transfecção** apresentaram uma correlação direta com o grau de ionização dos polycations, assim, as DIPEA-quitosanas de maior grau de substituição ($GS_{DIPEA} = 33$ e 59%) mediarão níveis de silenciamento de GFP em células HeLa (*knockdown* de até 50%) e de TNF α em macrófagos RAW (*knockdown* de até 60%) que foram similares aos alcançados pela Lipofectamina™. Estas nanoplataformas apresentaram **baixa citotoxicidade** em diferentes linhagens celulares: fibroblastos 3T3/NIH, queratinócitos HaCaT e células HeLa. Por fim, avaliou-se o potencial dos vetores da **Série II** em formulações de **uso tópico** voltadas para o tratamento da psoríase. Os nanocarreadores apresentaram uma boa interação com modelos de pele artificial (Strat-M®) e de origem animal (pele de orelha de porco), aumentando em até 4 vezes a retenção do siRNA na pele. Esses resultados foram corroborados pelos estudos *in vivo* em gerbilos da Mongólia, que indicaram a presença de nanopartículas em diferentes camadas da pele, com maior acúmulo no estrato córneo (SC) e identificando os folículos capilares como uma importante via de entrada dos vetores na pele. Formulações contendo DIPEA-quitosanas (ChD59-Peg) e siRNA anti-TNF α (siTNF α) foram topicamente aplicadas em gerbilos da Mongólia com inflamação similar a psoríase induzida por Imiquimod (IMQ) e as avaliações histopatológica e imuno-histoquímicas indicaram uma melhora no aspecto geral da pele dos animais tratados pelas nanopartículas (epiderme melhor

estruturada, menor infiltração de células e menor quantidade de capilares) em relação aos animais não tratados, além de uma diminuição da quantidade de $\text{TNF}\alpha$ e uma menor quantidade de células (principalmente fagocíticas) no local da inflamação. Os resultados obtidos destacam o potencial dos vetores desenvolvidos no tratamento tópico da psoríase e atestam o êxito no cumprimento do objetivo proposto.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAFEZ, Salma M.; HATHOUT, Rania M.; SAMMOUR, Omaira A. Tracking the transdermal penetration pathways of optimized curcumin-loaded chitosan nanoparticles via confocal laser scanning microscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 108, p. 753–764, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.170.

AGIRRE, Mireia; ZARATE, Jon; OJEDA, Edilberto; PURAS, Gustavo; DESBRIERES, Jacques; PEDRAZ, Jose Luis. Low molecular weight chitosan (LMWC)-based polyplexes for pDNA delivery: From bench to bedside. **Polymers**, [S. l.], v. 6, p. 1727–1755, 2014. DOI: 10.3390/polym6061727.

AIBANI, Noorjahan; RAI, Raj; PATEL, Parth; CUDDIHY, Grace; WASAN, Ellen K. Chitosan nanoparticles at the biological interface: implications for drug delivery. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 1686, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101686.

AL-KASSAS, Raida; WEN, Jingyuan; CHENG, Angel En Miao; KIM, Amy Moon Jung; LIU, Stephanie Sze Mei; YU, Joohee. Transdermal delivery of propranolol hydrochloride through chitosan nanoparticles dispersed in mucoadhesive gel. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 153, p. 176–186, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.06.096.

ALALAIWE, Ahmed; CARPINONE, Paul; ALSHAHRANI, Saad; ALSULAYS, Bader; ANSARI, Mohammed; ANWER, Mohammed; ALSHEHRI, Sultan; ALSHETAILI, Abdullah. Influence of chitosan coating on the oral bioavailability of gold nanoparticles in rats. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 171–175, 2019. DOI: 10.1016/j.jsps.2018.09.011.

ALAMEH, Mohamad; DE JESUS, Diogo; JEAN, Myriam; DARRAS, Vincent; THIBAUT, Marc; LAVERTU, Marc; BUSCHMANN, Michael D.; MERZOUKI, Abderrazzak. Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N:P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 7, p. 1399–1414, 2012. DOI: 10.2147/IJN.S26571.

ALAMEH, Mohamad; LAVERTU, Marc; TRAN-KHANH, Nicolas; CHANG, Chi Yuan; LESAGE, Frederic; BAIL, Martine; DARRAS, Vincent; CHEVRIER, Anik; BUSCHMANN, Michael D. siRNA Delivery with Chitosan: Influence of Chitosan Molecular Weight, Degree of Deacetylation, and Amine to Phosphate Ratio on in Vitro Silencing Efficiency, Hemocompatibility, Biodistribution, and in Vivo Efficacy. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 112–131, 2018. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01297.

ARABI, Fatemeh; MANSOURI, Vahid; AHMADBEIGI, Naser. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 153, n. June, p. 113324, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113324.

ARANDA-BARRADAS, María E.; TREJO-LÓPEZ, Saul E.; REAL, Alicia Del; ÁLVAREZ-ALMAZÁN, Samuel; MÉNDEZ-ALBORES, Abraham; GARCÍA-TOVAR, Carlos G.; GONZÁLEZ-DÍAZ, Francisco R.; MIRANDA-CASTRO, Susana Patricia. Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical, morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, [S. l.], v. 4, n. May, 2022. DOI: 10.1016/j.carpta.2022.100228.

ATMATZIDIS, D. H.; LAMBERT, W. C.; LAMBERT, M. W. Langerhans cell: exciting

developments in health and disease. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [S. l.], v. 31, n. 11, p. 1817–1824, 2017. DOI: 10.1111/jdv.14522.

AUGUSTINE, Robin; HASAN, Anwarul; PRIMAVERA, Rosita; WILSON, Rudilyn Joyce; THAKOR, Avnesh S.; KEVADIYA, Bhavesh D. Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. **Materials Today Communications**, [S. l.], v. 25, n. August, p. 101692, 2020. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2020.101692..

BALIWAG, Jaymie; BARNES, Drew H.; JOHNSTON, Andrew. Cytokines in psoriasis. **Cytokine**, [S. l.], v. 73, n. 2, p. 342–350, 2015. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.12.014.

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

BISHANI, Ali; CHERNOLOVSKAYA, Elena L. Activation of Innate Immunity by Therapeutic Nucleic Acids. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 24, p. 13360, 2021. DOI: 10.3390/ijms222413360.

BLANCO, Elvin; SHEN, Haifa; FERRARI, Mauro. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 9, p. 941–951, 2015. DOI: 10.1038/nbt.3330.

BOEHNCKE, Wolf Henning; SCHÖN, Michael P. Psoriasis. **The Lancet**, [S. l.], v. 386, n. 9997, p. 983–994, 2015. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61909-7.

BOYLES, Matthew S. P. et al. Chitosan functionalisation of gold nanoparticles encourages particle uptake and induces cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in phagocytic cells, as well as enhancing particle interactions with serum components. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 84, 2015. DOI: 10.1186/s12951-015-0146-9.

BREZINSKI, Elizabeth A.; DHILLON, Jaskaran S.; ARMSTRONG, April W. Economic burden of psoriasis in the United States a systematic review. **JAMA Dermatology**, [S. l.], v. 151, n. 6, p. 651–658, 2015. DOI: 10.1001/jamadermatol.2014.3593.

BUKACKOVA, Marta; RUSNOK, Pavel; MARSALEK, Roman. Mathematical Methods in the Calculation of the Zeta Potential of BSA. **Journal of Solution Chemistry**, [S. l.], v. 47, n. 12, p. 1942–1952, 2018. DOI: 10.1007/s10953-018-0830-0.

CABRAL, Horacio; MIYATA, Kanjiro; OSADA, Kensuke; KATAOKA, Kazunori. Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 118, n. 14, p. 6844–6892, 2018. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00199.

CAO, Ye; TAN, Yang Fei; WONG, Yee Shan; LIEW, Melvin Wen Jie; VENKATRAMAN, Subbu. Recent advances in chitosan-based carriers for gene delivery. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 17, n. 6, 2019. DOI: 10.3390/md17060381.

CASÉ, Ana Helena; PICOLA, Isadora Pfeifer Dalla; ZANIQUELLI, Maria Elisabete Darbello; FERNANDES, Júlio Cesar; TABOGA, Sebastião Roberto; WINNIK, Françoise M.; TIERA, Marcio José. Physicochemical characterization of nanoparticles formed between DNA and phosphorylcholine substituted chitosans. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 336, n. 1, p. 125–133, 2009. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.02.069.

CASEY, Joseph R.; GRINSTEIN, Sergio; ORLOWSKI, John. Sensors and regulators of intracellular pH. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 50–61, 2010. DOI: 10.1038/nrm2820.

CHEN, Qizhou; QI, Yi; JIANG, Yuwei; QUAN, Weiyan; LUO, Hui; WU, Kefeng; LI, Sidong; OUYANG, Qianqian. Progress in Research of Chitosan Chemical Modification Technologies and Their Applications. **Marine drugs**, [S. l.], v. 20, n. 8, 2022. DOI: 10.3390/md20080536.

CHUAH, Lay-Hong; LOO, Hooi-Leong; GOH, Choon Fu; FU, Ju-Yen; NG, Shiow-Fern. Chitosan-based drug delivery systems for skin atopic dermatitis: recent advancements and patent trends. **Drug Delivery and Translational Research**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 1436–1455, 2023. DOI: 10.1007/s13346-023-01307-w.

COK, Michela; VIOLA, Marco; VECCHIES, Federica; SACCO, Pasquale; FURLANI, Franco; MARSICH, Eleonora; DONATI, Ivan. N-isopropyl chitosan. A pH- and thermo-responsive polysaccharide for gel formation. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 230, n. November 2019, p. 115641, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115641.

CORNETTA, Kenneth; BONAMINO, Martín; MAHLANGU, Johnny; MINGOZZI, Federico; RANGARAJAN, Savita; RAO, Jayandharan. Gene therapy access: Global challenges, opportunities, and views from Brazil, South Africa, and India. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 2122–2129, 2022. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.04.002.

CROCE, Matteo; CONTI, Simona; MAAKE, Caroline; PATZKE, Greta R. Synthesis and screening of N-acyl thiolated chitosans for antibacterial applications. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 151, p. 1184–1192, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.06.014.

DE BRITO E CUNHA, Danielle; FREDERICO, Ana; AZAMOR, Tamiris; MELGAÇO, Juliana; DA COSTA NEVES, Patricia; BOM, Ana; TILLI, Tatiana; MISSAILIDIS, Sotiris. Biotechnological Evolution of siRNA Molecules: From Bench Tool to the Refined Drug. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 575, 2022. DOI: 10.3390/ph15050575.

DE SOUZA, Ricard Hallan Felix Viegas et al. Diethylaminoethyl- chitosan as an efficient carrier for siRNA delivery: Improving the condensation process and the nanoparticles properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 119, p. 186–197, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.072.

DEGORS, Isabelle M. S.; WANG, Cuifeng; REHMAN, Zia Ur; ZUHORN, Inge S. Carriers break barriers in drug delivery: endocytosis and endosomal escape of gene delivery vectors. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 52, n. 7, p. 1750–1760, 2019. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00177.

DEPIERI, Livia Vieira; BORGHETTI-CARDOSO, Livia Neves; CAMPOS, Patrícia Mazureki; OTAGUIRI, Katia Kaori; DE CARVALHO VICENTINI, Fabiana Testa Moura; LOPES, Luciana Biagini; FONSECA, Maria José Vieira; BENTLEY, M. Vitória Lopes Badra. RNAi mediated IL-6 in vitro knockdown in psoriasis skin model with topical siRNA delivery system based on liquid crystalline phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 105, p. 50–58, 2016. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.05.012.

DESMET, Eline; VAN GELE, Mireille; GRINE, Lynda; REMAUT, Katrien; LAMBERT, Jo. Towards the development of a RNAi-based topical treatment for psoriasis: Proof-of-concept in a 3D psoriasis skin model. **Experimental Dermatology**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 463–469, 2018. DOI: 10.1111/exd.13414.

DEVI, G. R. siRNA-based approaches in cancer therapy. **Cancer Gene Therapy**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 819–829, 2006. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700931.

DIAS, Amanda Manchini; DOS SANTOS CABRERA, Marcia Perez; LIMA, Aline Margarete Furuyama; TABOGA, Sebastião Roberto; VILAMAIOR, Patricia Simone Leite; TIERA, Marcio José; DE OLIVEIRA TIERA, Vera Aparecida. Insights on the antifungal activity of amphiphilic

derivatives of diethylaminoethyl chitosan against *Aspergillus flavus*. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 196, p. 433–444, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.05.032.

DIBAL, Nathan Isaac; GARBA, Sani Hyedima; JACKS, Tamunotonye Watson. Histological stains and their application in teaching and research. **Asian Journal of Health Sciences**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 43–43, 2022. DOI: 10.15419/ajhs.v8i2.514.

DING, Ling; TANG, Siyuan; WYATT, Todd A.; KNOELL, Daren L.; OUPICKÝ, David. Pulmonary siRNA delivery for lung disease: Review of recent progress and challenges. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 330, n. November 2019, p. 977–991, 2021. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.11.005.

DOS ANJOS CASSADO, Alexandra. F4/80 as a major macrophage marker: The case of the peritoneum and spleen. In: **Macrophages - Results and Problems in Cell Differentiation**. [s.l: s.n.]. v. 62p. 161–179. DOI: 10.1007/978-3-319-54090-0_7.

DOU, Rongkun et al. PAMs ameliorates the imiquimod-induced psoriasis-like skin disease in mice by inhibition of translocation of NF- κ B and production of inflammatory cytokines. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 1–19, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0176823.

DOWDY, Steven F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 222–229, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3802.

DRAGICEVIC, Nina; MAIBACH, Howard I. **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement**. Springer-V ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016. DOI: 10.1007/978-3-662-47862-2.

EKENTOK, Ceyda; ÖZBAŞ TURAN, Suna; AKBUĞA, Jülide. In vitro gene silencing effect of chitosan/shRNA PDGF-D nanoparticles in breast cancer. **Marmara Pharmaceutical Journal**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 793–803, 2017. DOI: 10.12991/mpj.2017.21.

ELLMAN, George L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959. DOI: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.

ELSABAHY, Mahmoud; WOOLEY, Karen L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 41, p. 2545–2561, 2012. DOI: 10.1039/c2cs15327k.

ENGKAGUL, Visuta; KLAHARN, I. yanut; SEREEMASPUN, Amornpun; CHIRACHANCHAI, Suwabun. Chitosan whisker grafted with oligo(lactic acid) nanoparticles via a green synthesis pathway: Potential as a transdermal drug delivery system. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 2523–2531, 2017. DOI: 10.1016/j.nano.2017.07.001.

ERMAN, Andreja; VERANIČ, Peter. The use of polymer chitosan in intravesical treatment of urinary bladder cancer and infections. **Polymers**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 1–10, 2018. DOI: 10.3390/polym10030265.

FACCHIN, Bruno Matheus; DOS REIS, Gustavo Oliveira; VIEIRA, Guilherme Nicácio; MOHR, Eduarda Talita Bramorski; DA ROSA, Júlia Salvan; KRETZER, Iara Fabricia; DEMARCHI, Izabel Galhardo; DALMARCO, Eduardo Monguilhott. Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. **Inflammation Research**, [S. l.], v. 71, n. 7–8, p. 741–758, 2022. DOI: 10.1007/s00011-022-01584-0.

FENG, Naibo; GUO, Fengjin. Nanoparticle-siRNA: A potential strategy for rheumatoid arthritis therapy? **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 325, n. June, p. 380–393, 2020. DOI:

10.1016/j.jconrel.2020.07.006.

FERNANDES, Rute; SMYTH, Neil R.; MUSKENS, Otto L.; NITTI, Simone; HEUER-JUNGEMANN, Amelie; ARDERN-JONES, Michael R.; KANARAS, Antonios G. Interactions of skin with gold nanoparticles of different surface charge, shape, and functionality. **Small**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 713–721, 2015. DOI: 10.1002/smll.201401913.

FIAMINGO, Anderson; CAMPANA-FILHO, Sergio Paulo. Structure, morphology and properties of genipin-crosslinked carboxymethylchitosan porous membranes. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 143, p. 155–163, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.02.016.

FOGH-ANDERSEN, Niels; ALTURA, Bella M.; ALTURA, Bella T.; SIGGAARD-ANDERSEN, Ole. Composition of interstitial fluid. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 41, n. 10, p. 1522–1525, 1995. DOI: 10.1093/clinchem/41.10.1522.

FRANCIS, Geoffrey L. Albumin and mammalian cell culture: Implications for biotechnology applications. **Cytotechnology**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 1–16, 2010. DOI: 10.1007/s10616-010-9263-3.

GANTENBEIN, Benjamin; TANG, Shirley; GUERRERO, Julien; HIGUITA-CASTRO, Natalia; SALAZAR-PUERTA, Ana I.; CROFT, Andreas S.; GAZDHAR, Amiq; PURMESSUR, Devina. Non-viral Gene Delivery Methods for Bone and Joints. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. November, p. 1–33, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.598466.

GARG, Unnati; CHAUHAN, Swati; NAGAICH, Upendra; JAIN, Neha. Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 195–204, 2019. DOI: 10.15171/apb.2019.023.

GIACOMELLI, Fernando C.; STEPÁNEK, Petr; GIACOMELLI, Cristiano; SCHMIDT, Vanessa; JÄGER, Eliézer; JÄGER, Alessandro; ULBRICH, Karel. PH-triggered block copolymer micelles based on a pH-responsive PDPA (poly[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate]) inner core and a PEO (poly(ethylene oxide)) outer shell as a potential tool for the cancer therapy. **Soft Matter**, [S. l.], v. 7, n. 19, p. 9316–9325, 2011. DOI: 10.1039/c1sm05992k.

GINN, Samantha L.; AMAYA, Anaïs K.; ALEXANDER, Ian E.; EDELSTEIN, Michael; ABEDI, Mohammad R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. **Journal of Gene Medicine**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 1–16, 2018. DOI: 10.1002/jgm.3015.

GOHIL, S. V.; PADMANABHAN, A.; DESCHAMPS, J.; NAIR, L. S. Chitosan-based scaffolds for growth factor delivery. In: **Chitosan Based Biomaterials Volume 2**. [s.l.] : Elsevier, 2017. v. 2p. 175–207. DOI: 10.1016/B978-0-08-100228-5.00007-9.

GORMLEY, Adam J.; GHANDEHARI, Hamidreza. Evaluation of Toxicity of Nanostructures in Biological Systems. In: **Nanotoxicity: From In Vivo and In Vitro Models to Health Risks**. [s.l.: s.n.]. p. 115–159. DOI: 10.1002/9780470747803.ch7.

GORZELANNY, Christian; MESS, Christian; SCHNEIDER, Stefan W.; HUCK, Volker; BRANDNER, Johanna M. Skin barriers in dermal drug delivery: Which barriers have to be overcome and how can we measure them? **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 1–31, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070684.

GRILLO, Renato; DIAS, Fabiana V.; QUEROBINO, Samyr M.; ALBERTO-SILVA, Carlos; FRACETO, Leonardo F.; DE PAULA, Eneida; DE ARAUJO, Daniele R. Influence of hybrid polymeric nanoparticle/thermosensitive hydrogels systems on formulation tracking and in vitro artificial membrane permeation: A promising system for skin drug-delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 174, n. May 2018, p. 56–62, 2019. DOI:

10.1016/j.colsurfb.2018.10.063.

GUO, Xiaomin; WANG, Huan; LI, Yang; LENG, Xiaopeng; HUANG, Weiwei; MA, Yanbing; XU, Tao; QI, Xiaopeng. Transfection reagent Lipofectamine triggers type I interferon signaling activation in macrophages. **Immunology & Cell Biology**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 92–96, 2019. DOI: 10.1111/imcb.12194.

HAFNER, Anita; LOVRIĆ, Jasmina; PEPIĆ, Ivan; FILIPOVIĆ-GRČIĆ, Jelena. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 807–815, 2011. DOI: 10.3109/02652048.2011.622053.

HE, Chunbai; YIN, Lichen; TANG, Cui; YIN, Chunhua. Trimethyl Chitosan-Cysteine Nanoparticles for Systemic Delivery of TNF- α siRNA via Oral and Intraperitoneal Routes. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 2596–2606, 2013. DOI: 10.1007/s11095-013-1086-4.

HEIDARI, Razieh; KHOSRAVIAN, Pegah; MIRZAEI, Seyed Abbas; ELAHIAN, Fatemeh. siRNA delivery using intelligent chitosan-capped mesoporous silica nanoparticles for overcoming multidrug resistance in malignant carcinoma cells. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00085-0.

HEJAZI, Radi; AMIJI, Mansoor. Chitosan-Based Delivery Systems: Physicochemical Properties and Pharmaceutical Applications. In: DUMITRIU, Severian (org.). **Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded**. 2nd Editio ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 213–237. DOI: 10.1201/9780203904671-12.

HERMANSON, Greg T. The Reactions of Bioconjugation. **Bioconjugate Techniques**, [S. l.], p. 229–258, 2013. DOI: 10.1016/b978-0-12-382239-0.00003-0.

HERRERA, Victoria L. M.; COLBY, Aaron H.; RUIZ-OPAZO, Nelson; COLEMAN, David G.; GRINSTAFF, Mark W. Nucleic acid nanomedicines in Phase II/III clinical trials: Translation of nucleic acid therapies for reprogramming cells. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 13, n. 16, p. 2083–2098, 2018. DOI: 10.2217/nnm-2018-0122.

HOY, Sheridan M. Patisiran: First Global Approval. **Drugs**, [S. l.], v. 78, n. 15, p. 1625–1631, 2018. DOI: 10.1007/s40265-018-0983-6.

HSIAO, Pa Fan; TSAI, Hsieh Chih; PENG, Sydney; PRASANAN, Adhimoorthy; TANG, Ting Cheng; CHANG, Hao Ming; CHEN, Yu Shuan; LIN, Shuiian Yin; HSIUE, Ging Ho. Transdermal delivery of poly(ethylene glycol)-co-oleylamine modified gold nanoparticles: Effect of size and shape. **Materials Chemistry and Physics**, [S. l.], v. 224, n. November 2017, p. 22–28, 2019. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2018.11.060.

HU, Bo; ZHONG, Liping; WENG, Yuhua; PENG, Ling; HUANG, Yuanyu; ZHAO, Yongxiang; LIANG, Xing Jie. Therapeutic siRNA: state of the art. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-0207-x.

HUANG, Min; KHOR, Eugene; LIM, Lee Yong. **Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation**. **Pharmaceutical Research**, 2004. DOI: 10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.a5.

HUANG, Xiaohua; EL-SAYED, Mostafa A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 13–28, 2010. DOI: 10.1016/j.jare.2010.02.002.

JABEEN, Mehwish; BOISGARD, Anne Sophie; DANOY, Alix; KHOLTI, Naima El; SALVI,

Jean Paul; BOULIEU, Roselyne; FROMY, Bérangère; VERRIER, Bernard; LAMRAYAH, Myriam. Advanced characterization of imiquimod-induced psoriasis-like mouse model. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1–18, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090789.

JAFARI, Hafez; BERNAERTS, Katrien V.; DODI, Gianina; SHAVANDI, Amin. Chitooligosaccharides for wound healing biomaterials engineering. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 117, n. July, p. 111266, 2020. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111266.

JAIN, Ankit; GULBAKE, Arvind; SHILPI, Satish; JAIN, Ashish; HURKAT, Pooja; JAIN, Sanjay K. A new horizon in modifications of chitosan: Syntheses and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 91–181, 2013. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013005678.

JAVAEED, Arslan; QAMAR, Shanza; ALI, Sundus; MUSTAFA, Mir Ahmad Talha; NUSRAT, Areeba; GHOURI, Sanniya Khan. Histological Stains in the Past, Present, and Future. **Cureus**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 13–18, 2021. DOI: 10.7759/cureus.18486.

JIANG, Li Qun; WANG, Ting Yu; WEBSTER, Thomas J.; DUAN, Hua Jian; QIU, Jing Ying; ZHAO, Zi Ming; YIN, Xiao Xing; ZHENG, Chun Li. Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: Intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 12, p. 6383–6398, 2017. DOI: 10.2147/IJN.S142060.

JUAREZ-MORENO, Karla; AYALA, Marcela; VAZQUEZ-DUHALT, Rafael. Antioxidant Capacity of Poly(Ethylene Glycol) (PEG) as Protection Mechanism Against Hydrogen Peroxide Inactivation of Peroxidases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 177, n. 6, p. 1364–1373, 2015. DOI: 10.1007/s12010-015-1820-y.

JUNG, Sang Myung et al. Thermodynamic Insights and Conceptual Design of Skin-Sensitive Chitosan Coated Ceramide/PLGA Nanodrug for Regeneration of Stratum Corneum on Atopic Dermatitis. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 5, n. December, p. 1–12, 2015. DOI: 10.1038/srep18089.

KAMATA, Masahiro; TADA, Yayoi. Dendritic Cells and Macrophages in the Pathogenesis of Psoriasis. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 13, n. June, p. 1–10, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.941071.

KARAS, Vlad O.; WESTERLAKEN, Ilja; MEYER, Anne S. Application of an in vitro DNA protection assay to visualize stress mediation properties of the Dps protein. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], n. 75, p. 1–7, 2013. DOI: 10.3791/50390-v.

KASAAI, Mohammad R.; ARUL, Joseph; CHIN, See L.; CHARLET, Gérard. The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 201–205, 1999. DOI: 10.1016/S1010-6030(98)00432-8.

KAST, Constantia E.; BERNKOP-SCHNÜRCH, Andreas. Thiolated polymers - thiomers: Development and in vitro evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates. **Biomaterials**, [S. l.], v. 22, n. 17, p. 2345–2352, 2001. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00421-X.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010. DOI: 10.1016/j.addr.2009.09.004.

KELESIDIS, Georgios A.; GAO, Daniel; STARSICH, Fabian H. L.; PRATSINIS, Sotiris E. Light Extinction by Agglomerates of Gold Nanoparticles: A Plasmon Ruler for Sub-10 nm Interparticle Distances. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 94, n. 13, p. 5310–5316, 2022. DOI:

10.1021/acs.analchem.1c05145.

KIM, Byungji; PARK, Ji Ho; SAILOR, Michael J. Rekindling RNAi Therapy: Materials Design Requirements for In Vivo siRNA Delivery. **Advanced Materials**, [S. l.], v. 31, n. 49, p. 1–23, 2019. DOI: 10.1002/adma.201903637.

KIM, Hye Sung; SON, Young Ju; MAO, Wei; LEONG, Kam W.; YOO, Hyuk Sang. Atom Transfer Radical Polymerization of Multishelled Cationic Corona for the Systemic Delivery of siRNA. **Nano Letters**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 314–325, 2018. a. DOI: 10.1021/acs.nanolett.7b04183.

KIM, Hyun Jin et al. Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. **ACS Nano**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 8979–8991, 2014. DOI: 10.1021/nn502125h.

KIM, Hyun Jin; KIM, Ahram; MIYATA, Kanjiro; KATAOKA, Kazunori. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 104, p. 61–77, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2016.06.011.

KIM, Yena; PARK, Narae; RIM, Yeri Alice; NAM, Yoojun; JUNG, Hyerin; LEE, Kijun; JU, Ji Hyeon. Establishment of a complex skin structure via layered co-culture of keratinocytes and fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018. b. DOI: 10.1186/s13287-018-0958-2.

KOLI, Uday; NILGIRIWALA, Kayzad; SRIRAMAN, Kalpana; JAIN, Ratnesh; DANDEKAR, Prajakta. Targeting tuberculosis infection in macrophages using chitosan oligosaccharide nanoplexes. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1007/s11051-019-4623-1.

KORCHAGINA, Evgeniya V.; PHILIPPOVA, Olga E. Effects of hydrophobic substituents and salt on core-shell aggregates of hydrophobically modified chitosan: Light scattering study. **Langmuir**, [S. l.], v. 28, n. 20, p. 7880–7888, 2012. DOI: 10.1021/la3013409.

KREBS, H. A. Chemical Composition of Blood Plasma and Serum. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 409–430, 1950. DOI: 10.1146/annurev.bi.19.070150.002205.

KU, Sook Hee; KIM, Kwangmeyung; CHOI, Kuiwon; KIM, Sun Hwa; KWON, Ick Chan. Tumor-targeting multifunctional nanoparticles for sirna delivery: Recent advances in cancer therapy. **Advanced Healthcare Materials**, [S. l.], v. 3, n. 8, p. 1182–1193, 2014. DOI: 10.1002/adhm.201300607.

LABALA, Suman; JOSE, Anup; VENUGANTI, Venkata Vamsi Krishna. Transcutaneous iontophoretic delivery of STAT3 siRNA using layer-by-layer chitosan coated gold nanoparticles to treat melanoma. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 146, p. 188–197, 2016. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.076.

LAYEK, B.; SINGH, J. Chitosan for DNA and gene therapy. In: **Chitosan Based Biomaterials**. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2017. v. 2p. 209–244. DOI: 10.1016/B978-0-08-100228-5.00008-0.

LEE, You Jeong; AHN, Eun-Young; PARK, Youmie. Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 129, 2019. DOI: 10.1186/s11671-019-2967-1.

LEONEL, Ellen Cristina Rivas; RUIZ, Thalles Fernando Rocha; BEDOLO, Carolina Marques; CAMPOS, Silvana Gisele Pegorin; TABOGA, Sebastião Roberto. Inflammatory repercussions in female steroid responsive glands after perinatal exposure to bisphenol A and 17- β estradiol.

Cell Biology International, [S. l.], v. 45, n. 11, p. 2264–2274, 2021. DOI: 10.1002/cbin.11665.

LI, Chen Wen; LI, Lan Lan; CHEN, Sheng; ZHANG, Jian Xiang; LU, Wan Liang. Antioxidant Nanotherapies for the Treatment of Inflammatory Diseases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. March, p. 1–20, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00200.

LI, Yanan; ZHANG, Junling; WANG, Buhai; SHEN, Yan; OUAHAB, Ammar. Co-delivery of siRNA and hypericin into cancer cells by hyaluronic acid modified PLGA-PEI nanoparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 737–746, 2016. DOI: 10.3109/03639045.2015.1091469.

LI, Yubin; ZENG, Xian; WANG, Shaofei; SUN, Yun; WANG, Ziyu; FAN, Jiajun; SONG, Ping; JU, Dianwen. Inhibition of autophagy protects against PAMAM dendrimers-induced hepatotoxicity. **Nanotoxicology**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 344–355, 2015. DOI: 10.3109/17435390.2014.930533.

LIANG, Mingtao; LIN, I. Chun; WHITTAKER, Michael R.; MINCHIN, Rodney F.; MONTEIRO, Michael J.; TOTH, Istvan. Cellular uptake of densely packed polymer coatings on gold nanoparticles. **ACS Nano**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 403–413, 2010. DOI: 10.1021/nn9011237.

LIANG, Ye et al. Self-crosslinkable chitosan-hyaluronic acid dialdehyde nanoparticles for CD44-targeted siRNA delivery to treat bladder cancer. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 433–446, 2021. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.08.019.

LIN, Guimiao; LI, Li; PANWAR, Nishtha; WANG, Jie; TJIN, Swee Chuan; WANG, Xiaomei; YONG, Ken Tye. Non-viral gene therapy using multifunctional nanoparticles: Status, challenges, and opportunities. **Coordination Chemistry Reviews**, [S. l.], v. 374, p. 133–152, 2018. DOI: 10.1016/j.ccr.2018.07.001.

LIN, Weiji; SHEN, Pan; SONG, Yaqin; HUANG, Ying; TU, Shenghao. Reactive Oxygen Species in Autoimmune Cells: Function, Differentiation, and Metabolism. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, n. February, p. 1–16, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.635021.

LIU, Lijun et al. Functional nano-systems for transdermal drug delivery and skin therapy. **Nanoscale Advances**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 1527–1558, 2023. DOI: 10.1039/d2na00530a.

LIU, Shuai et al. Highly branched poly(β -amino ester) delivery of minicircle DNA for transfection of neurodegenerative disease related cells. **Nature Communications**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-11190-0.

LONČAREVIĆ, Andrea; IVANKOVIĆ, Marica; ROGINA, Anamarija. Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterisation of Degraded Chitosan Scaffolds. **Journal of Tissue Repair and Regeneration**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 12–22, 2017. DOI: 10.14302/issn.2640-6403.jtrr-17-1840.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. **Journal of Amino Acids**, [S. l.], v. 2012, p. 1–26, 2012. DOI: 10.1155/2012/736837.

MA, Odette; LAVERTU, Marc; SUN, Jun; NGUYEN, Sophie; BUSCHMANN, Michael D.; WINNIK, Françoise M.; HOEMANN, Caroline D. Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 616–624, 2008. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.10.004.

MALEK, Anastasia; MERKEL, Olivia; FINK, Ludger; CZUBAYKO, Frank; KISSEL, Thomas; AIGNER, Achim. In vivo pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(-PEG)/siRNA complexes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 236,

n. 1, p. 97–108, 2009. DOI: 10.1016/j.taap.2009.01.014.

MALIK, Shipra; SALTZMAN, W. Mark; BAHAL, Raman. Extracellular vesicles mediated exocytosis of antisense peptide nucleic acids. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [S. l.], v. 25, n. September, p. 302–315, 2021. DOI: 10.1016/j.omtn.2021.07.018.

MANSUR, Herman S.; MANSUR, Alexandra A. P.; CURTI, Elisabete; DE ALMEIDA, Mauro V. Functionalized-chitosan/quantum dot nano-hybrids for nanomedicine applications: Towards biolabeling and biosorbing phosphate metabolites. **Journal of Materials Chemistry B**, [S. l.], v. 1, n. 12, p. 1696–1711, 2013. DOI: 10.1039/c3tb00498h.

MAREPALLY, S.; BOAKYE, C. H. A.; PATEL, A. R.; GODUGU, C.; DODDAPANENI, R.; DESAI, P. R.; SINGH, M. Topical administration of dual siRNAs using fusogenic lipid nanoparticles for treating psoriatic-like plaques. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 9, n. 14, p. 2157–2174, 2014. DOI: 10.2217/nmm.13.202.

MARTINEZ JUNIOR, André Miguel; DE SOUZA, Ricchard Hallan Felix Viegas; PETRÔNIO, Maicon Segalla; MARTINS, Grazieli Olinda; FERNANDES, Júlio Cesar; BENDERDOUR, Mohamed; TIERA, Vera Aparecida Oliveira De; TIERA, Marcio José. Double-grafted chitosans as siRNA nanocarriers: effects of diisopropylethylamine substitution and labile-PEG coating. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, [S. l.], n. 0123456789, 2022. a. DOI: 10.1007/s40097-022-00487-0.

MARTINEZ JUNIOR, André Miguel; LIMA, Aline Margarete Furuyama; MARTINS, Grazieli Olinda; TIERA, Vera Aparecida de Oliveira; BENDERDOUR, Mohamed; FERNANDES, Julio Cesar; TIERA, Marcio José. Impact of Degree of Ionization and PEGylation on the Stability of Nanoparticles of Chitosan Derivatives at Physiological Conditions. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 476, 2022. b. DOI: 10.3390/md20080476.

MARTINS, Grazieli Olinda; SEGALLA PETRÔNIO, Maicon; FURUYAMA LIMA, Aline Margarete; MARTINEZ JUNIOR, André Miguel; DE OLIVEIRA TIERA, Vera Aparecida; DE FREITAS CALMON, Marília; LEITE VILAMAIOR, Patricia Simone; HAN, Sang Won; TIERA, Marcio José. Amphipathic chitosans improve the physicochemical properties of siRNA-chitosan nanoparticles at physiological conditions. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 216, p. 332–342, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.03.098.

MASS, Elvira; NIMMERJAHN, Falk; KIERDORF, Katrin; SCHLITZER, Andreas. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 23, p. 563–579, 2023. DOI: 10.1038/s41577-023-00848-y.

MEI, Jingxia; ZHANG, Nan; YU, Yuanyuan; WANG, Qiang; YUAN, Jiugang; WANG, Ping; CUI, Li; FAN, Xuerong. A novel “trifunctional protease” with reducibility, hydrolysis, and localization used for wool anti-felting treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 102, n. 21, p. 9159–9170, 2018. DOI: 10.1007/s00253-018-9276-y.

MEIRA, Alianise da Silva; BATTISTEL, Ana Paula; TEIXEIRA, Helder Ferreira; VOLPATO, Nadia Maria. Evaluation of porcine skin layers separation methods, freezing storage and anatomical site in in vitro percutaneous absorption studies using penciclovir formulations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], v. 60, n. December 2019, p. 101926, 2020. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101926.

MELAMED, Jilian R.; KREUZBERGER, Nicole L.; GOYAL, Ritu; DAY, Emily S. Spherical Nucleic Acid Architecture Can Improve the Efficacy of Polycation-Mediated siRNA Delivery. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [S. l.], v. 12, n. September, p. 207–219, 2018. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.05.008.

MEMON, Abdul Ghaffar; CHANNA, Iftikhar Ahmed; SHAIKH, Asif Ahmed; AHMAD, Jabran; SOOMRO, Abdul Fatah; GIWA, Abdulmoseen Segun; BAIG, Zenab Tariq; MAHDI, Wael A.; ALSHEHRI, Sultan. Citrate-Capped AuNP Fabrication, Characterization and Comparison with Commercially Produced Nanoparticles. **Crystals**, [S. l.], v. 12, p. 1747, 2022. DOI: 10.3390/cryst12121747.

METWALLY, Abdelkader A.; POURZAND, Charareh; BLAGBROUGH, Ian S. Efficient gene silencing by self-assembled complexes of siRNA and symmetrical fatty acid amides of spermine. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 125–140, 2011. DOI: 10.3390/pharmaceutics3020125.

MIRZAEI, Sepideh et al. Small interfering RNA (siRNA) to target genes and molecular pathways in glioblastoma therapy: Current status with an emphasis on delivery systems. **Life Sciences**, [S. l.], v. 275, n. March, p. 119368, 2021. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119368.

MOBARAKEH, Vahid Iranpur; MODARRESSI, Mohammad Hossein; RAHIMI, Pooneh; BOLHASSANI, Azam; AREFIAN, Ehsan; ATYABI, Fatemeh; VAHABPOUR, Rouhollah. Optimization of chitosan nanoparticles as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 129, p. 305–315, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.036.

MONIZ, Tânia; COSTA LIMA, Sofia A.; REIS, Salette. Protocol for the isolation of stratum corneum from pig ear skin: Evaluation of the trypsin digestion conditions. **Methods and Protocols**, [S. l.], v. 4, n. 4, 2021. DOI: 10.3390/mps4040080.

MORARU, Cristina; MINCEA, Manuela; MENGHIU, Gheorghita; OSTAFE, Vasile. Understanding the factors influencing chitosan-based nanoparticles-protein corona interaction and drug delivery applications. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 20, p. 1–37, 2020. DOI: 10.3390/molecules25204758.

MOYA BETANCOURT, Sara N.; URANGA, Jorge G.; JUAREZ, Ana V.; CÁMARA, Candelaria I.; POZO LÓPEZ, Gabriela; RIVA, Julieta S. Effect of bare and polymeric-modified magnetic nanoparticles on the drug ion transfer across liquid/liquid interfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 919, n. June, p. 116502, 2022. DOI: 10.1016/j.jelechem.2022.116502.

NAM, Joung Pyo; NAH, Jae Woon. Target gene delivery from targeting ligand conjugated chitosan-PEI copolymer for cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 135, p. 153–161, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.08.053.

NANOBRAND. **Leading Gold and Silver Nanoparticles Research and Manufacturing Nanogold and Nanosilver for Life Sciences and Biotech**. 2022. Disponível em: <https://nanobrand.com/>.

NEMATI, Houshang; GHAHRAMANI, Mohammad Hosein; FARIDI-MAJIDI, Reza; IZADI, Babak; BAHRAMI, Gholamreza; MADANI, Seyed Hamid; TAVOOSIDANA, Gholamreza. Using siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation in psoriasis. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 268, n. October, p. 259–268, 2017. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.10.034.

NEUPANE, Rabin; BODDU, Sai H. S.; RENUKUNTLA, Jwala; BABU, R. Jayachandra; TIWARI, Amit K. Alternatives to biological skin in permeation studies: Current trends and possibilities. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 2, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12020152.

NGUYEN, Chi Thanh; TRAN, Thanh Huyen; LU, Xiuling; KASI, Rajeswari M. Self-assembled nanoparticles from thiol functionalized liquid crystalline brush block copolymers for dual encapsulation of doxorubicin and gold nanoparticles. **Polymer Chemistry**, [S. l.], v. 5, n. 8, p.

2774–2783, 2014. DOI: 10.1039/c3py01636f.

OGAWA, Eisaku; SATO, Yuki; MINAGAWA, Akane; OKUYAMA, Ryuhei. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. **Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 264–272, 2018. DOI: 10.1111/1346-8138.14139.

OLIVEIRA, Franciele De Paula Pansani; PICOLA, Isadora Pfeifer Dalla; SHI, Qin; BARBOSA, Hellen Franciane Gonçalves; DE OLIVEIRA TIERA, Vera Aparecida; FERNANDES, Júlio Cesar; TIERA, Marcio José. Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: Composition effects on the in vitro transfection efficiency. **Nanotechnology**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 1–11, 2013. DOI: 10.1088/0957-4484/24/5/055101.

OSBORNE, David W.; MUSAKHANIAN, Jasmine. Skin Penetration and Permeation Properties of Transcutol®—Neat or Diluted Mixtures. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 3512–3533, 2018. DOI: 10.1208/s12249-018-1196-8.

ÖZBAŞ-TURAN, Suna; AKBUĞA, Jülide. Plasmid DNA-loaded chitosan/TPP nanoparticles for topical gene delivery. **Drug Delivery**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 215–222, 2011. DOI: 10.3109/10717544.2010.544688.

PANDI, Palpandi; JAIN, Anjali; KOMMINENI, Nagavendra; IONOV, Maksim; BRYSEWSKA, Maria; KHAN, Wahid. Dendrimer as a new potential carrier for topical delivery of siRNA: A comparative study of dendriplex vs. lipoplex for delivery of TNF- α siRNA. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 550, n. 1–2, p. 240–250, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.024.

PANDI, Palpandi; JAIN, Anjali; RAJU, Saka; KHAN, Wahid. Therapeutic approaches for the delivery of TNF- α siRNA. **Therapeutic Delivery**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 343–355, 2017. DOI: 10.4155/tde-2017-0011.

PANDIT, Ashish; INDURKAR, Abhishek; DESHPANDE, Chinmay; JAIN, Ratnesh; DANDEKAR, Prajakta. A systematic review of physical techniques for chitosan degradation. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, [S. l.], v. 2, n. January, p. 100033, 2021. DOI: 10.1016/j.carpta.2021.100033.

PATHOMTHONGTAWEECHAI, Nutthapoom; MUANPRASAT, Chatchai. Potential applications of chitosan-based nanomaterials to surpass the gastrointestinal physiological obstacles and enhance the intestinal drug absorption. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 6, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13060887.

PATIL, Suryaji et al. The development of functional non-viral vectors for gene delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 21, p. 1–23, 2019. DOI: 10.3390/ijms20215491.

PETRIN, Thais H. Cost.; FADEL, Valmir; MARTINS, Danubia B.; DIAS, Susana A.; CRUZ, Ana; SERGIO, Luciana Marciano; ARCISIO-MIRANDA, Manoel; CASTANHO, Miguel A. R. B.; DOS SANTOS CABRERA, Marcia P. Synthesis and Characterization of Peptide-Chitosan Conjugates (PepChis) with Lipid Bilayer Affinity and Antibacterial Activity. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 20, n. 7, p. 2743–2753, 2019. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00501.

PHILIPPOVA, Olga E.; KORCHAGINA, Evgeniya V.; VOLKOV, Evgeny V.; SMIRNOV, Valery A.; KHOKHLOV, Alexei R.; RINAUDO, Marguerite. Aggregation of some water-soluble derivatives of chitin in aqueous solutions: Role of the degree of acetylation and effect of hydrogen bond breaker. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 87, n. 1, p. 687–694, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.08.043.

- PICOLA, Isadora Pfeifer Dalla; SHI, Qin; FERNANDES, Júlio Cesar; PETRÔNIO, Maicon Segalla; LIMA, Aline Margarete Furuyama; DE OLIVEIRA TIERA, Vera Aparecida; TIERA, Marcio José. Chitosan derivatives for gene transfer: effect of phosphorylcholine and diethylaminoethyl grafts on the in vitro transfection efficiency. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [S. l.], v. 27, n. 16, p. 1611–1630, 2016. DOI: 10.1080/09205063.2016.1225333.
- PIOTROWICZ-CIEŚLAK, Agnieszka I.; MACIEJCZYK, Maciej; MARGAS, Małgorzata; RYDZYŃSKI, Dariusz; GRAJEK, Hanna; MICHALCZYK, Dariusz J.; WASILEWSKI, Janusz; SMYK, Bogdan. Studies on the Efficiency of Iron Release from Fe(III)-EDTA and Fe(III)-Cit and the Suitability of These Compounds for Tetracycline Degradation. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 23, 2022. DOI: 10.3390/molecules27238498.
- PITZANTI, Giulia; ROSA, Antonella; NIEDDU, Mariella; VALENTI, Donatella; PIREDDU, Rosa; LAI, Francesco; CARDIA, Maria Cristina; FADDA, Anna Maria; SINICO, Chiara. Transcutol® p containing slns for improving 8-methoxypsoralen skin delivery. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 10, p. 1–14, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12100973.
- PLEŃKOWSKA, Joanna; GABIG-CIMIŃSKA, Magdalena; MOZOLEWSKI, Paweł. Oxidative stress as an important contributor to the pathogenesis of psoriasis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 17, p. 1–15, 2020. DOI: 10.3390/ijms21176206.
- POWELL, Leigh G.; ALEXANDER, Cameron; STONE, Vicki; JOHNSTON, Helinor J.; CONTE, Claudia. An in vitro investigation of the hepatic toxicity of PEGylated polymeric redox responsive nanoparticles. **RSC Advances**, [S. l.], v. 12, n. 20, p. 12860–12870, 2022. DOI: 10.1039/d2ra00395c.
- PRAÇA, Fabíola Silva Garcia; MEDINA, Wanessa Silva Garcia; ELOY, Josimar O.; PETRILLI, Raquel; CAMPOS, Patrícia Mazureki; ASCENSO, Andreia; BENTLEY, Maria Vitória L. B. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 111, n. April 2017, p. 121–132, 2018. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.09.034.
- PREALL, Jonathan B.; SONTHEIMER, Erik J. RNAi: RISC Gets Loaded. **Cell**, [S. l.], v. 123, n. 4, p. 543–545, 2005. DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.006.
- QU, Fei; GENG, Rui; LIU, Yijing; ZHU, Jintao. Advanced nanocarrier- and microneedle-based transdermal drug delivery strategies for skin diseases treatment. **Theranostics**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 3372–3406, 2022. DOI: 10.7150/thno.69999.
- RAHME, Kamil; CHEN, Lan; HOBBS, Richard G.; MORRIS, Michael A.; O'DRISCOLL, Caitriona; HOLMES, Justin D. PEGylated gold nanoparticles: Polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. **RSC Advances**, [S. l.], v. 3, n. 17, p. 6085–6094, 2013. DOI: 10.1039/c3ra22739a.
- RAJU, Gayathri; KATYAR, Neeraj; VADUKUMPULLY, Sajini; SHANKARAPPA, Sahadev A. Penetration of gold nanoparticles across the stratum corneum layer of thick-Skin. **Journal of Dermatological Science**, [S. l.], v. 89, n. 2, p. 146–154, 2018. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.11.001.
- RIZK, M.; TÜZMEN, S. Patisiran for the treatment of patients with familial amyloid polyneuropathy. **Drugs of Today**, [S. l.], v. 55, n. 5, p. 315–327, 2019. DOI: 10.1358/dot.2019.55.5.2958475.
- ROBBINS, Marjorie; JUDGE, Adam; MACLACHLAN, Ian. SiRNA and innate immunity. **Oligonucleotides**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 89–101, 2009. DOI: 10.1089/oli.2009.0180.

ROMÁN-DOVAL, Ramón; TORRES-ARELLANES, Sandra P.; TENORIO-BARAJAS, Aldo Y.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, Alejandro; VALENCIA-LAZCANO, Anai A. Chitosan: Properties and Its Application in Agriculture in Context of Molecular Weight. **Polymers**, [S. l.], v. 15, n. 13, p. 1–26, 2023. DOI: 10.3390/polym15132867.

ROSA, Juliana; SUZUKI, Isabella; KRAVICZ, Marcelo; CARON, Angelo; PUPO, Ana Vitória; PRAÇA, Fabíola Garcia; BENTLEY, Maria Vitória Lopes Badra. Current Non-viral siRNA Delivery Systems as a Promising Treatment of Skin Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 24, n. 23, p. 2644–2663, 2018. DOI: 10.2174/1381612824666180807120017.

RUMENGAN, I. F. M.; SURYANTO, E.; MODASO, R.; WULLUR, S.; TALLEI, T. E.; LIMBONG, D. Structural Characteristics of Chitin and Chitosan Isolated from the Biomass of Cultivated Rotifer, *Brachionus rotundiformis*. **International Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 12–18, 2014.

SAJID, Muhammad Imran; MOAZZAM, Muhammad; TIWARI, Rakesh Kumar; KATO, Shun; CHO, Kayley Yeseom. Overcoming barriers for siRNA therapeutics: From bench to bedside. **Pharmaceuticals**, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 1–25, 2020. DOI: 10.3390/ph13100294.

SARGAZI, Saman; ARSHAD, Rabia; GHAMARI, Reza; RAHDAR, Abbas; BAKHSHI, Ali; KARKAN, Sonia Fathi; AJALLI, Narges; BILAL, Muhammad; DÍEZ-PASCUAL, Ana M. siRNA-based nanotherapeutics as emerging modalities for immune-mediated diseases: A preliminary review. **Cell Biology International**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 1320–1344, 2022. DOI: 10.1002/cbin.11841.

SAVA, Vasyli; FIHURKA, Oksana; KHVOROVA, Anastasia; SANCHEZ-RAMOS, Juan. Enriched chitosan nanoparticles loaded with siRNA are effective in lowering Huntington's disease gene expression following intranasal administration. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S. l.], v. 24, p. 102119, 2020. DOI: 10.1016/j.nano.2019.102119.

SCHIPPER, N. G.; OLSSON, S.; HOOGSTRAATE, J. A.; DEBOER, A. G.; VÅRUM, K. M.; ARTURSSON, P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. **Pharmaceutical research**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 923–9, 1997. DOI: 10.1023/a:1012160102740.

SEBER, S.; SIRIN, DY; YETISYIGIT, T.; BILGEN, T. Piperlongumine Increases the Apoptotic Effect of Doxorubicin and Paclitaxel in a Cervical Cancer Cell Line. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 386–391, 2020. DOI: 10.4103/njcp.njcp_80_19.

SERRANO-SEVILLA, Inés; ARTIGA, Álvaro; MITCHELL, Scott G.; DE MATTEIS, Laura; DE LA FUENTE, Jesús M. Natural polysaccharides for siRNA delivery: Nanocarriers based on chitosan, hyaluronic acid, and their derivatives. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 14, 2019. DOI: 10.3390/molecules24142570.

SHAABANI, Elnaz; SHARIFIAGHDAM, Maryam; DE KEERSMAECKER, Herlinde; DE RYCKE, Riet; DE SMEDT, Stefaan; FARIDI-MAJIDI, Reza; BRAECKMANS, Kevin; FRAIRE, Juan C. Layer by layer assembled chitosan-coated gold nanoparticles for enhanced siRNA delivery and silencing. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 1–23, 2021. DOI: 10.3390/ijms22020831.

SHANG, Li; NIENHAUS, Karin; NIENHAUS, Gerd Ulrich. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 5, 2014. DOI: 10.1186/1477-3155-12-5.

SHERKOW, Jacob S.; ZETTLER, Patricia J.; GREELY, Henry T. Is it 'gene therapy'? [S. l.], n. September, p. 786–793, 2018. DOI: 10.1093/jlb/lxy020.

SHIN, Jinseob; SHIN, Kyomin; LEE, Hanna; SUH, Kyung Do; KIM, Hyojung; KIM, Jin Woong. Enhanced transdermal delivery by using electrostatically interactive chitosan nanocapsules. **Colloid and Polymer Science**, [S. l.], v. 290, n. 6, p. 553–559, 2012. DOI: 10.1007/s00396-011-2580-z.

SHUKLA, Ravi S.; JAIN, Akshay; ZHAO, Zhen; CHENG, Kun. Intracellular trafficking and exocytosis of a multi-component siRNA nanocomplex. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 1323–1334, 2016. DOI: 10.1016/j.nano.2016.02.003.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 159–166, 1999. DOI: 10.1007/s002890050448.

SILVESTRINI, Ana Vitória Pupo; GARCIA PRAÇA, Fabíola; LEITE, Marcel Nani; DE ABREU FANTINI, Márcia Carvalho; FRADE, Marco Andrey Cipriani; BADRA BENTLEY, Maria Vitória Lopes. Liquid crystalline nanoparticles enable a multifunctional approach for topical psoriasis therapy by co-delivering triptolide and siRNAs. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 640, n. April, 2023. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123019.

SINGH, Ram S.; SAINI, Gaganpreet K.; KENNEDY, John F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 73, n. 4, p. 515–531, 2008. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.01.003.

SONI, Jalpa. Use of nanostructures based on noble metals in nanobiomedicine. In: **Nanostructures for Novel Therapy**. [s.l.] : Elsevier, 2017. p. 685–712. DOI: 10.1016/B978-0-323-46142-9.00025-6.

STAFF, A. C. An introduction to gene therapy and its potential prenatal use. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, [S. l.], v. 80, n. 6, p. 485–491, 2001. DOI: 10.1034/j.1600-0412.2001.080006485.x.

SUZUKI, Isabella Luiz; DE ARAUJO, Margarete Moreno; BAGNATO, Vanderlei Salvador; BENTLEY, Maria Vitoria Lopes Badra. TNF α siRNA delivery by nanoparticles and photochemical internalization for psoriasis topical therapy. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 338, n. August 2020, p. 316–329, 2021. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.08.039.

SWAIN, S. K.; DEY, R. K.; ISLAM, M.; PATEL, R. K.; JHA, Usha; PATNAIK, Tanushree; AIROLDI, Claudio. Removal of fluoride from aqueous solution using aluminum-impregnated chitosan biopolymer. **Separation Science and Technology**, [S. l.], v. 44, n. 9, p. 2096–2116, 2009. DOI: 10.1080/01496390902881212.

TADOLINI, Bruna. Iron oxidation in mops buffer. Effect of edta, hydrogen peroxide and fecl3. **Free Radical Research**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 173–182, 1987. DOI: 10.3109/10715768709088102.

TAMURA, Atsushi; YUI, Nobuhiko. Lysosomal-specific cholesterol reduction by biocleavable polyrotaxanes for ameliorating niemann-pick type C disease. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 4, n. 4356, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1038/srep04356.

TASSET, Aaron; BELLAMKONDA, Arjun; WANG, Wenliang; PYATNITSKIY, Ilya; WARD, Deidra; PEPPAS, Nicholas; WANG, Huiliang. Overcoming barriers in non-viral gene delivery for neurological applications. **Nanoscale**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 3698–3719, 2022. DOI: 10.1039/d1nr06939j.

TIERA, Marcio; SHI, Qin; BARBOSA, Hellen; FERNANDES, Julio. Polymeric Systems as

Nanodevices for siRNA Delivery. **Current Gene Therapy**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 358–369, 2013. DOI: 10.2174/156652321305131212125042.

TRACEY, Shannon R.; SMYTH, Peter; BARELLE, Caroline J.; SCOTT, Christopher J. Development of next generation nanomedicine-based approaches for the treatment of cancer: we've barely scratched the surface. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 49, n. 5, p. 2253–2269, 2021. DOI: 10.1042/BST20210343.

TRAN, Thanh Huyen; AMIJI, Mansoor M. Targeted delivery systems for biological therapies of inflammatory diseases. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 393–414, 2015. DOI: 10.1517/17425247.2015.972931.

TREUEL, Lennart; JIANG, Xiue; NIENHAUS, Gerd Ulrich. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. **Journal of the Royal Society Interface**, [S. l.], v. 10, n. 82, p. 1–14, 2013. DOI: 10.1098/rsif.2012.0939.

USHIJIMA, Yuri; OHNIWA, Ryosuke; MORIKAWA, Kazuya. In vitro DNA Protection Assay Using Oxidative Stress. **BIO-PROTOCOL**, [S. l.], v. 5, n. 14, p. 1–6, 2015. DOI: 10.21769/BioProtoc.1538.

VAN WOENSEL, Matthias et al. Development of siRNA-loaded chitosan nanoparticles targeting Galectin-1 for the treatment of glioblastoma multiforme via intranasal administration. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 227, p. 71–81, 2016. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.02.032.

VENUGOPAL, Vijayan; JAYACHANDRAN. Transdermal delivery of insulin by biodegradable chitosan nanoparticles: Exvivo and in vivo studies. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 315–321, 2012.

VERMA, Priyanka; SRIVASTAVA, Aasheesh; SRIKANTH, C. V.; BAJAJ, Avinash. Nanoparticle-mediated gene therapy strategies for mitigating inflammatory bowel disease. **Biomaterials Science**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 1481–1502, 2021. DOI: 10.1039/d0bm01359e.

VILLAR-ALVAREZ, Eva et al. SiRNA silencing by chemically modified biopolymeric nanovectors. **ACS Omega**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 3904–3921, 2019. DOI: 10.1021/acsomega.8b02875.

WANG, Changrong et al. Harnessing pH-Sensitive Polycation Vehicles for the Efficient siRNA Delivery. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 2218–2229, 2021. DOI: 10.1021/acsaami.0c17866.

WANG, Qi Zhao; CHEN, Xi Guang; LIU, Nan; WANG, Shi Xi; LIU, Cheng Sheng; MENG, Xiang Hong; LIU, Chen Guang. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 194–201, 2006. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.01.001.

WANG, Tao; LARCHER, Leon M.; MA, Lixia; VEEDU, Rakesh N. Systematic screening of commonly used commercial transfection reagents towards efficient transfection of single-stranded oligonucleotides. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 10, 2018. DOI: 10.3390/molecules23102564.

WATANABE, K. **Photochemistry on nanoparticles**. [s.l.] : Elsevier, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.13211-1.

WEECHARANGSAN, Wanlop; OPANASOPIT, Praneet; NGAWHIRUNPAT, Tanasait; APIRAKARAMWONG, Auayporn; ROJANARATA, Theerasak; RUKTANONCHAI, Uracha; LEE, Robert J. Evaluation of chitosan salts as non-viral gene vectors in CHO-K1 cells.

International Journal of Pharmaceutics, [S. l.], v. 348, n. 1–2, p. 161–168, 2008. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.07.011.

WU, Shu Wei; LIU, Xifeng; MILLER, A. Lee; CHENG, Yu Shiuan; YEH, Ming Long; LU, Lichun. Strengthening injectable thermo-sensitive NIPAAm-g-chitosan hydrogels using chemical cross-linking of disulfide bonds as scaffolds for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 192, p. 308–316, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.03.047.

WULANDARI, Anggi Shestita; TANDRASASMITA, Olivia Mayasari; TJANDRAWINATA, Raymond Rubianto. Immunomodulatory and macrophage activating activity of *Lactobacillus fermentum* DLBSA204 in response to respiratory infection in a cellular model. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 1291–1302, 2016. DOI: 10.13005/bbra/2269.

XIONG, Qingqing; CUI, Mangmang; YU, Ge; WANG, Jian; SONG, Tianqiang. Facile fabrication of reduction-responsive supramolecular nanoassemblies for co-delivery of doxorubicin and sorafenib toward hepatoma cells. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. FEB, p. 1–11, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.00061.

XU, Zhizhong et al. Comparisons of three polyethyleneimine-derived nanoparticles as a gene therapy delivery system for renal cell carcinoma. **Journal of Translational Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 46, 2011. DOI: 10.1186/1479-5876-9-46.

XUAN DU, Dang; XUAN VUONG, Bui; MAI, Hien Duy. Study on Preparation of Water-Soluble Chitosan with Varying Molecular Weights and Its Antioxidant Activity. **Advances in Materials Science and Engineering**, [S. l.], v. 2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/8781013.

YANG, Chuanxu; GAO, Shan; DAGNÆS-HANSEN, Frederik; JAKOBSEN, Maria; KJEMS, Jørgen. Impact of PEG Chain Length on the Physical Properties and Bioactivity of PEGylated Chitosan/siRNA Nanoparticles in Vitro and in Vivo. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [S. l.], v. 9, n. 14, p. 12203–12216, 2017. a. DOI: 10.1021/acsami.6b16556.

YANG, Qiping et al. pH-Sensitive Polycations for siRNA Delivery: Effect of Asymmetric Structures of Tertiary Amine Groups. **Macromolecular Bioscience**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1002/mabi.202100025.

YANG, Shaozhe; ZHOU, Xiaoling; LI, Rongxiang; FU, Xiuhong; SUN, Pingnan. Optimized PEI-based Transfection Method for Transient Transfection and Lentiviral Production. **Current protocols in chemical biology**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 147–157, 2017. b. DOI: 10.1002/cpch.25.

YANG, Yanmei; GUO, Meng; QIAN, Rui; LIU, Chang; ZONG, Xumin; LI, Yong Qiang; LI, Weifeng. Binding efficacy and kinetics of chitosan with DNA duplex: The effects of deacetylation degree and nucleotide sequences. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 169, p. 451–457, 2017. c. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.04.040.

ZAMBOULIS, Alexandra; NANAKI, Stavroula; MICHAILIDOU, Georgia; KOUMENTAKOU, Ioanna; LAZARIDOU, Maria; AINALI, Nina Maria; XANTHOPOULOU, Eleftheria; BIKIARIS, Dimitrios N. Chitosan and its derivatives for ocular delivery formulations: Recent advances and developments. **Polymers**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 9–11, 2020. DOI: 10.3390/polym12071519.

ZHANG, Chun Ge et al. Novel polymer micelle mediated co-delivery of doxorubicin and P-glycoprotein siRNA for reversal of multidrug resistance and synergistic tumor therapy. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. March, p. 1–12, 2016. a. DOI: 10.1038/srep23859.

ZHANG, Demeng; SONG, Yizhe; WANG, Yu; LIU, Xiudong; YU, Weiting; MA, Xiaojun.

Insight of in Vitro Small-Interfering RNA Release from Chitosan Nanoparticles under Enzymolysis with Förster Resonance Energy Transfer Analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 301–307, 2016. b. DOI: 10.1002/jps.24698.

ZHAO, Lili; JIANG, Di; CAI, Yue; JI, Xiaohui; XIE, Renguo; YANG, Wensheng. Tuning the size of gold nanoparticles in the citrate reduction by chloride ions. **Nanoscale**, [S. l.], v. 4, n. 16, p. 5071–5076, 2012. DOI: 10.1039/c2nr30957b.

ZHAO, Yun Chun et al. Efficient delivery of Notch1 siRNA to SKOV3 cells by cationic cholesterol derivative-based liposome. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 11, p. 5485–5496, 2016. DOI: 10.2147/IJN.S115367.

ZHOU, Guoyong; XU, Yongmin; CHEN, Meiwan; CHENG, Du; SHUAI, Xintao. Tumor-penetrating peptide modified and pH-sensitive polyplexes for tumor targeted siRNA delivery. **Polymer Chemistry**, [S. l.], v. 7, n. 23, p. 3857–3863, 2016. DOI: 10.1039/c6py00427j.

ZHOU, Kejin; LIU, Haoming; ZHANG, Shanrong; HUANG, Xiaonan; WANG, Yiguang; HUANG, Gang; SUMER, Baran D.; GAO, Jinming. Multicolored pH-tunable and activatable fluorescence nanoplatfrom responsive to physiologic pH stimuli. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 134, n. 18, p. 7803–7811, 2012. DOI: 10.1021/ja300176w.

ZIMON, Rinat Lifshiz et al. Ultrasound targeting of Q-starch/miR-197 complexes for topical treatment of psoriasis. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 284, n. June, p. 103–111, 2018. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.05.040.

ZSIKÓ, Stella; CUTCHER, Kendra; KOVÁCS, Anita; BUDAI-SZÚCS, Mária; GÁCSI, Attila; BAKI, Gabriella; CSÁNYI, Erzsébet; BERKÓ, Szilvia. Nanostructured lipid carrier gel for the dermal application of lidocaine: Comparison of skin penetration testing methods. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 1–11, 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11070310.

ZU, Hui; GAO, Danchen. Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. **AAPS Journal**, [S. l.], v. 23, n. 4, 2021. DOI: 10.1208/s12248-021-00608-7.