UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Nanodispersões de fase líquido-cristalina como carreadoras de siRNA no tratamento tópico da psoríase: Avaliação em modelos *in vitro* e *in vivo*

Lívia Vieira Depieri

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Nanodispersões de fase líquido-cristalina como carreadoras de siRNA no tratamento tópico da psoríase: Avaliação em modelos *in vitro* e *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Lívia Vieira Depieri

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Depieri, Lívia Vieira

Nanodispersões de fase líquido-cristalina como carreadoras de siRNA no tratamento tópico da psoríase: Avaliação em modelos *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2016.

126 p.; 30cm.

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

Orientadora: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

1. siRNA. 2. Nanodispersão líquido-cristalina. 3. Psoríase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lívia Vieira Depieri

Nanodispersões de fase líquido-cristalina como carreadoras de siRNA no tratamento tópico da psoríase: Avaliação em modelos *in vitro* e *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Aos meus amados avós
***Darcy e Olindo**,*
por todo amor e incentivo constante
em todos os momentos...

À minha querida mãe
Libânia,
por todo amor e parceria,
por acreditar nos meus sonhos
e me ajudar a consquistá-los...

Ao meu amado companheiro
Thiago,
por ser tão especial em minha vida,
por me apoiar e me ajudar a ser cada dia uma
pessoa melhor...
Te amo!

À toda minha
Família e Amigos
com quem pude compartilhar histórias e alegrias
durante essa caminhada...

Agradecimentos

À Deus, por todas as experiências vividas, permitindo meu crescimento e amadurecimento emocional e espiritual.

À minha orientadora Prof^{a}. Dr^{a}. Maria Vitória Lopes Badra Bentley pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa, pelo aprendizado diário, pelo exemplo profissional e pessoal e pela confiança. Obrigada por esses 10 anos de amizade e parceria que tanto contribuíram e contribuem para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Luciana Biagini Lopes pelas colaborações tão valiosas ao longo desse trabalho. Obrigada pela amizade, carinho e incentivo, por ser um grande exemplo profissional, meus sinceros agradecimentos e a mais profunda admiração.

Ao Prof. Dr. Robert Langer e ao Prof. Dr. Daniel Griffith Anderson pela colaboração, pelo imenso aprendizado e importante contribuição científica durante a realização do estágio sanduíche. Foi uma imensa honra trabalhar com vocês!

Ao Dr. Yizhou Dong, Dr. Gaurav Sahay e ao Dr. Roman Bogorad pela colaboração, dedicação, auxílio na execução dos experimentos e discussões enriquecedoras realizadas durante o estágio sanduíche.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Lúcia Helena Faccioli pela colaboração e ensinamentos durante a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Francisco Wanderley Garcia Paula e Silva pela dedicação, atenção, auxílio na execução dos experimentos, pelas trocas de experiência, ensinamentos, e, sobretudo, pela amizade. Muito obrigada por tudo Francisco!

Às técnicas do Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses, Alyne Fávero Galvão Meirelles e Caroline Fontanari pela amizade, dedicação e auxílios durante a realização desta pesquisa.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Maria José Vieira Fonseca pela colaboração e ensinamentos durante a realização desta pesquisa.

À Prof[a]. Dr[a]. Soraia Katia Pereira Costa e seus alunos Tuanny Priscila Schmidt, Anderson Romerio e Leandro Rodrigues pela colaboração, ensinamentos e auxílio nos experimentos com o modelo *in vivo* de psoríase.

Aos amigos e técnicos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Fabíola, Henrique e José Orestes, pela ajuda, apoio e companheirismo.

A todos os amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pós-graduandos e estagiários, em especial à Larissa, Lívia, Marcelo, Margarete e Patrícia pelo apoio, incentivo, ensinamentos e amizade. E àqueles que também passaram pelo laboratório e participaram da minha caminhada científica. Em especial à Fábia, Fabiana, Marina e Samantha, obrigada pela conviência maravilhosa, pelos ensinamentos e pela amizade que permanece até hoje!

À minha querida amiga Katia Kaori Otaguiri pela amizade sincera, carinho, pela colaboração para realização deste trabalho e por tantos momentos importantes compartilhados.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – FMRP-USP, à Camila Cristina de Oliveira Menezes Bonaldo e à Daiane Fernanda dos Santos pela colaboração e auxílio nas análises de citometria de fluxo.

Ao Laboratório de Imunofluorescência da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – FMRP-USP, à Danielle Aparecida Rosa de Magalhães e à Joseane Serrano pela colaboração, ensinamentos e auxílio com o preparo das lâminas histológicas.

Ao Laboratório de Microscopia Avançada da FCFRP-USP e ao Eduardo Tozzato pelas análises por microscopia confocal.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação pelo excelente serviço prestado.

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

Ao Albany College of Pharmacy and Healthy Sciences.

Ao Massachusetts Institute of Technology e ao Koch Institute for Integrative Cancer Research.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – FMRP-USP.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa de doutorado (processo n°. 141927/2012-7) e pela bolsa de doutorado sanduíche (processo n°. 210002/2013-1).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado (processo n°. 2012/09125-8).

À todos aqueles que, de alguma forma, participaram da execução deste trabalho, tornando possível sua realização, meus sinceros agradecimentos.

Olhar para trás após uma longa caminhada pode fazer perder a noção da distância que percorremos, mas se nos detivermos em nossa imagem, quando a iniciamos e ao término, certamente nos lembraremos do quanto nos custou chegar até o ponto final, e hoje temos a impressão de que tudo começou ontem...

João Guimarães Rosa

RESUMO

DEPIERI, L. V. **Nanodispersões de fase líquido-cristalina como carreadoras de siRNA no tratamento tópico da psoríase: Avaliação em modelos *in vitro* e *in vivo*.** 2016. 160 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A terapia gênica por interferência de RNA (RNAi) é um processo de silenciamento gênico pós-transcricional onde moléculas de *small interfering* RNA (siRNA) específicas são capazes de suprimir a expressão de um determinado gene. Atualmente, é uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de muitas doenças graves, incluindo doenças cutâneas. No entanto, dificuldades relacionadas à administração e à biodistribuição limitam a utilização clínica dos siRNAs. Neste contexto, foi proposto o uso de um nanocarreador a base de cristais líquidos para viabilizar a aplicação de siRNAs no tratamento tópico da psoríase. A nanodispersão líquido-cristalina (NLC) desenvolvida, composta por monoleína, ácido oleico, polietilenoimina e fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p), foi capaz de superar as barreiras da via de administração tópica, bem como as limitações resultantes das características das moléculas de siRNA. A NLC foi capaz de complexar o siRNA, protege-lo por 24 h da degradação enzimática e liberá-lo de forma intacta. A NLC promoveu uma alta taxa de captação celular do siRNA em fibroblastos e macrófagos. Sua aplicação tópica pode ser considerada segura para a pele, pois manteve a viabilidade da epiderme humana reconstruída acima de 50% e a quantidade de IL-1α liberada foi inferior a 60 pg/mL. A NLC apresentou eficácia em promover a liberação funcional do siRNA nos modelos *in vitro* avaliados. No modelo de pele humana reconstruída psoriática, reduziu os níveis de IL-6 (~ 70%) após um único tratamento por 6 h e, os níveis do RNAm *IL6* (~ 50%) após o tratamento por 3 dias consecutivos. Em macrófagos, reduziu os níveis do RNAm *Tnf* em 40% após o tratamento concomitante com LPS por 24 h e, em 60% após o tratamento por 24 h pós-estímulo prévio com LPS. A eficácia foi ainda maior com o pré-tratamento por 24 h seguido do estímulo com LPS, que normalizou os níveis do RNAm *Tnf*. O tratamento tópico com a NLC veiculando siRNA *Tnf* foi eficaz em reduzir significativamente os níveis do RNAm *Tnf* nos modelos *in vivo* de inflamação cutânea aguda induzida por TPA (~ 60%) e de psoríase induzida por imiquimode (~ 90%) avaliados. No modelo *in vivo* de psoríase, o tratamento tópico com a NLC veiculando siRNA *Tnf* também reduziu significativamente a atividade da mieloperoxidade (~ 65%) e a espessura da epiderme (~ 70%) em comparação aos grupos controle. Também foi eficaz na melhora fenotípica dos animais, reduzindo o rubor, descamação, acantose e o número de ataques de coceira, resultados da redução do processo inflamatório decorrente da ação efetiva das moléculas de siRNA *Tnf*. A NLC também promoveu a penetração cutânea das moléculas de siRNA nas camadas mais profundas da pele, *in vivo*. Face aos resultados obtidos, pode-se concluir que a NLC é uma estratégia relevante para a administração tópica de siRNAs, que mostrou potencial terapêutico para suprimir genes específicos relacionados a doenças de pele.

Palavras-chave: siRNA, Nanodispersão líquido-cristalina, Psoríase, Terapia gênica

ABSTRACT

DEPIERI, L. V. **Liquid crystalline nanodispersions as a siRNA carrier in the topical treatment of psoriasis: Evaluation in *in vitro* and *in vivo* models.** 2016. 160 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Gene therapy by RNA interference (RNAi) is a post-transcriptional gene silencing process in which specific small interfering RNA (siRNA) molecules can suppress the expression of a particular gene. Currently, is a promising therapeutic approach for the treatment of many severe disorders, including skin diseases. However, difficulties related to the administration and biodistribution limit the clinical use of siRNAs. In this context, a nanocarrier based in liquid crystal has been proposed to enable the application of siRNAs in the topical treatment of psoriasis. The liquid crystalline nanodispersion (LCN) developed, composed by monoolein, oleic acid, polyethylenimine and aqueous phase (8:2:1:89, w/w/w/w), was able to overcome the barriers of topical administration route, as well as limitations resulting from the characteristics of the siRNA molecules. The LCN was able to complex the siRNA, protect it for 24 h from enzymatic degradation and release it in an intact form. The LNC promoted a high cellular uptake of siRNA in fibroblasts and macrophages. Its topical application can be considered safe to the skin since viability of the reconstructed human epidermis remained above 50% and the amount of IL-1α released is less than 60 pg/mL. The LCN showed efficacy in promoting functional release of siRNA in *in vitro* models evaluated. In psoriatic reconstructed human skin model, it reduced the IL-6 levels (~ 70%) after a single treatment for 6 h and the mRNA *IL6* levels (~ 50%) after treatment for 3 consecutive days. In macrophages, it reduced the mRNA *Tnf* levels in 40% after the concomitant treatment with LPS for 24 h and, in 60% with treatment for 24 h after prior stimulation with LPS. The efficiency was higher with the pretreatment for 24 h followed by stimulation with LPS, that normalized the RNAm *Tnf* levels. Topical treatment with NLC carrying siRNA *Tnf* was effective in reduce significantly the mRNA *Tnf* levels in *in vivo* models of skin acute inflammation induced by TPA (~ 60%) and of psoriasis induced by imiquimod (~ 90%) evaluated. In the *in vivo* model of psoriasis, topical treatment with the NLC carrying siRNA *Tnf* also significantly reduced activity of myeloperoxidase (~ 65%) and the epidermis thickness (~ 70%) compared to control groups. It has also been effective in animal phenotypic improvement, reducing redness, desquamation, acanthosis and the number of itch attacks, results of the reduction in inflammatory process obtained by the effective action of siRNA *Tnf* molecules. The LCN also promoted the penetration of siRNA molecules into the deeper layers of the skin *in vivo*. With the results obtained, we can conclude that the LCN is a relevant strategy for topical administration of siRNAs, which showed therapeutic potential to suppress specific genes related to skin diseases.

Keywords: siRNA, Liquid crystalline nanodispersion, Psoriasis, Gene therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cronologia do desenvolvimento e aplicações da Interferência por RNA. ...2
Figura 2 - Mecanismo de interferência por RNA. Adaptado de (HUANG; LIU, 2011). 4
Figura 3 - Estrutura da molécula de siRNA. Adaptado de (DE FOUGEROLLES et al., 2007). 5
Figura 4 - Estrutura molecular do polímero catiônico PEI (YIN et al., 2014). 8
Figura 5 - Esquematização do mecanismo de escape endossomal de nanopartículas preparadas com PEI, conhecido como "efeito esponja de prótons". Adaptado de (HUANG; LIU, 2011). 9
Figura 6 - Esquematização do mecanismo de escape endossomal de nanopartículas lipídicas por [A] desestabilização da membrana endossomal e por [B] formação de fase hexagonal. Adaptado de (HUANG; LIU, 2011). 11
Figura 7 - Estrutura molecular da monoleína (PAN et al., 2013). 13
Figura 8 - Representação esquemática das diversas fases líquido-cristalinas formadas pela monoleína em presença de água. Adaptado de: ("Cubic Phase Particles in Drug Delivery", 2012). 14
Figura 9 - Diagrama esquemático do impacto da estrutura lipídica, aumento da concentração de água e estímulos externos sobre o fator de empacotamento e curvatura. Adaptado de (NGUYEN, 2008; CHANG et al., 2015). 16
Figura 10 - Esquema evolutivo do quadro imunoinflamatório característico na psoríase. Adaptado de (NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009). 20
Figura 11 - Método para obtenção das NLCs compostas por MO:FA (10:90, p/p) e MO:AO:FA (8:2:90, p/p) incorporadas com os adjuvantes catiônicos PEI ou OAM. O siRNA foi adicionado às NLCs após o processo de sonicação. 28
Figura 12 - Condicionamento dos tecidos EpiDerm™. (1) Material necessário para o condicionamento dos tecidos; (2) Remoção da placa contendo os tecidos em ambiente estéril da embalagem; (3) Abertura da placa contendo os tecidos em ambiente estéril para a remoção dos *inserts* da matriz de agarose; (4) Tecidos transferidos para placa de 6 poços contendo 900 µL de meio de cultura pré-aquecido. 33
Figura 13 - Etapas do ensaio de irritação cutânea por MTT. (A) Aplicação das formulações nos *inserts*; (B) Tratamento dos tecidos com o reagente de MTT; (C) Extração. 35

Figura 14 - Esquema do protocolo do ensaio imunoenzimático ELISA para quantificação de IL-1α humana (Invitrogen, Camarillo, CA, USA).....36
Figura 15 - Disposição dos *inserts* na placa de cultivo para a realização dos tratamentos. 38
Figura 16 - Esquema do protocolo do ensaio imunoenzimático ELISA para quantificação de IL-6 humana (Invitrogen, Camarillo, CA, USA).....39
Figura 17 - Etapas para extração do RNA dos tecidos utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). 41
Figura 18 - Etapas para extração do RNA das células utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). 48
Figura 19 - Esquema do protocolo experimental para a determinação da eficácia *in vivo* da NLC (MO:AO:PEI:FA, 8:2:1:89, p/p/p/p) veiculando siRNA em modelo de inflamação aguda induzida com TPA. 52
Figura 20 - Protocolo experimental de indução de psoríase com IMQ associado ao tratamento com a NLC isenta e veiculando siRNA controle ou siRNA *Tnf*.....54
Figura 21 - Captação e a viabilidade celular do siRNA-FAM, complexos formados entre os adjuvantes catiônicos PEI e OAM com siRNA-FAM e as NLCs complexadas com siRNA-FAM determinado por citometria de fluxo. siRNA-FAM na concentração final de 20 nM/poço (20 pmol siRNA/6x10^5 células/mL de meio de cultura). Resultados representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão.....61
Figura 22 - Dot plot representativo do siRNA-FAM, complexos formados entre os adjuvantes catiônicos PEI e OAM com siRNA-FAM e as NLCs complexadas com siRNA-FAM determinado por citometria de fluxo. siRNA-FAM na concentração final de 20 nM/poço (20 pmol siRNA/6x10^5 células/mL de meio de cultura). 62
Figura 23 - Ensaio de eletroforese em gel de agarose para avaliação da eficiência de complexação e integridade do siRNA na NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) por meio do ensaio de competição com poliânion. siRNA 10 μM (faixa 1), siRNA 10 μM + heparina (faixa 2), NLC (faixa 3), NLC + heparina (faixa 4), NLC + siRNA 10 μM (faixa 5) e NLC + siRNA 10 μM + heparina (faixa 6).....65
Figura 24 - Ensaio de eletroforese em gel de agarose para avaliação da estabilidade do siRNA em presença de RNase: [A] siRNA livre (faixa 1) e em presença de RNase (2 μg) em função do tempo: 30 min (faixa 2), 1 h (faixa 3), 3 h (faixa 4), 6 h (faixa 5), 12 h (faixa 6), 18 h (faixa 7), 24 h (faixa 8); [B] Avaliação da habilidade da NLC

composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) em proteger o siRNA da degradação enzimática; siRNA 10 μM + heparina (faixa 1), siRNA 10 μM + RNase + heparina (faixa 2), RNase + NLC (faixa 3), RNase + NLC + heparina (faixa 4), siRNA 10 μM + RNase + NLC (faixa 5), siRNA 10 μM + RNase + NLC + heparina (faixa 6). 66

Figura 25 - [A] Viabilidade dos tecidos da epiderme humana reconstruída (EpiDerm™) e [B] níveis extracelulares de IL-1α após tratamento tópico da EpiDerm™ com a NLC composta por MO:OA:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) e controles: PBS e Triton X-100 por 2, 5 e 12 h. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. A análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação aos tratamentos PBS e NLC. 68

Figura 26 - [A] Viabilidade dos tecidos da epiderme humana reconstruída (EpiDerm™) e [B] níveis extracelulares IL-1α após tratamento tópico da EpiDerm™ com a NLC composta por MO:OA:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) sem e com siRNA controle, solução de PEI:FA sem e com siRNA controle, PBS, siRNA controle e Triton X-100 por 3 dias (6 h de incubação com os tratamentos seguido da incubação por 18 h sem os tratamentos). siRNA controle na concentração final de 10 μM. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. A análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao tratamento PBS. 70

Figura 27 - Níveis extracelulares de IL-6 quantificados por ELISA após o tratamento dos tecidos de pele psoriática por 6 h com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *IL6* e os controles: PBS, siRNA *IL6* em água livre de RNase, NLC isenta de siRNA *IL6* e complexo PEI:FA (1:99, p/p) com siRNA *IL6*. siRNA *IL6* na concentração final de 10 μM. Os resultados representam a média de 4-6 determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; $^{\&}$p<0,05 em relação ao grupo siRNA *IL6*; $^{\$}$p<0,05 em relação ao grupo NLC; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo PEI:FA + siRNA *IL6*. 73

Figura 28 - Níveis extracelulares de IL-6 quantificados por ELISA e níveis do RNAm *IL6* quantificados por qRT-PCR após o tratamento dos tecidos de pele psoriática por 24 h (6 h incubação com as formulações e 18 h incubação sem as formulações) com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *IL6* e os

controles: PBS, siRNA *IL6* em água livre de RNase e NLC isenta de siRNA *IL6*. siRNA *IL6* na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo siRNA *IL6*.....75

Figura 29 - Níveis extracelulares de IL-6 quantificados por ELISA e níveis do RNAm *IL6* quantificados por qRT-PCR após o tratamento dos tecidos de pele psoriática por 72 h (6 h incubação com as formulações e 18 h incubação sem as formulações por 3 dias consecutivos) com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *IL6* e os controles: PBS, siRNA *IL6* em água livre de RNase e NLC isenta de siRNA *IL6*. siRNA *IL6* na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; #p<0,05 em relação ao grupo siRNA *IL6*; &p<0,05 em relação ao grupo NLC. 77

Figura 30 - [A] Captação e viabilidade celular; [B] Dot plot representativo do siRNA-FAM, NLC (MO:AO:PEI:FA – 8:2:1:89, p/p/p/p) com siRNA-FAM e a Lipofectamina 2000 com siRNA-FAM determinado por citometria de fluxo. siRNA-FAM na concentração final de 45 nM/poço (dose de 7,5 pmol/poço/1x10^5 células). Resultados representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão.....79

Figura 31 - Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de macrófagos da linhagem J774 tratados por 24 h com a) PBS; b) solução de siRNA-FAM em água livre de RNase; c) Lipofectamina veiculando siRNA-FAM; d) NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) veiculando siRNA-FAM. siRNA-FAM na concentração final de 45 nM/poço (dose de 7,5 pmol/poço/1x10^5 células). As imagens representam a sobreposição máxima de secções ópticas *xy* em função da profundidade (*z*). As células fixadas foram coradas com DAPI e Faloidina/Texas-red para visualização do núcleo (azul) e F-actina (vermelho), respectivamente. Lasers: UV (405 nm), emissão: 420 – 516 nm (azul); Visível (488 nm), emissão: 494 – 599 nm (verde); Visível (552 nm), emissão: 593 – 698 nm (vermelho). Objetiva 63X, barra: 40 µm. 80

Figura 32 - Ensaio de eletroforese em gel de agarose para avaliação da eficiência de complexação de diferentes doses de siRNA *Tnf* pela NLC (MO:AO:PEI:FA -

8:2:1:89, p/p/p/p) diluída em PBS (1:100) utilizadas do experimento *in vitro* de silenciamento gênico. 82

Figura 33 - Efeito da NLC (MO:AO:PEI:FA - 8:2:1:89, p/p/p/p), sem ou com siRNA controle ou *Tnf* e da Lipofectamina sem ou com siRNA controle ou *Tnf* e em associação ao LPS (500 ng mL^{-1}/poço) sobre a viabilidade celular dos macrófagos da linhagem J774. siRNA controle ou *Tnf* na dose final de 60 pmol/poço/$1x10^5$ células. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. 83

Figura 34 - Níveis do RNAm *Tnf* quantificados por qRT-PCR após o tratamento concomitante dos macrófagos da linhagem J774 por 6 h com LPS e a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) ou Lipofectamina isentas de siRNA e contendo siRNA controle (60 pmol) ou diferentes doses de siRNA *Tnf* (7,5, 30 e 60 pmol). Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo LPS; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo LPS + Lipofectamina; $^{\&}$p<0,05 em relação ao grupo LPS + Lipofectamina + siRNA controle (60 pmol). 84

Figura 35 - Níveis do RNAm *Tnf* quantificados por qRT-PCR após o tratamento concomitante dos macrófagos da linhagem J774 por 24 h com LPS e a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) ou Lipofectamina isentas de siRNA e contendo siRNA controle (60 pmol) ou diferentes doses de siRNA *Tnf* (7,5, 30 e 60 pmol). Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo LPS; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo LPS + NLC. 86

Figura 36 - Níveis do RNAm *Tnf* quantificados por qRT-PCR após o tratamento dos macrófagos da linhagem J774 por 2 h com LPS e 24 h com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) ou Lipofectamina isentas de siRNA e contendo siRNA controle (60 pmol) ou diferentes doses de siRNA *Tnf* (7,5, 30 e 60 pmol). Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo LPS; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo LPS + NLC + siRNA controle (60 pmol); $^{\$}$p<0,05 em relação ao

grupo LPS + NLC; [&]p<0,05 em relação ao grupo LPS + Lipofectamina + siRNA controle (60 pmol). 88
Figura 37 - Níveis do RNAm *Tnf* quantificados por qRT-PCR após o tratamento dos macrófagos da linhagem J774 por 24 h com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) e Lipofectamina isentas de siRNA e contendo siRNA controle (60 pmol) ou diferentes doses de siRNA *Tnf* (7,5, 30 e 60 pmol) seguido do tratamento com LPS por 2 h. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo LPS; [#]p<0,05 em relação ao grupo NLC + LPS; [$]p<0,05 em relação ao grupo NLC + siRNA controle (60 pmol) + LPS. 90
Figura 38 - Efeito da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *Tnf* na normalização do aumento nos níveis do RNAm *Tnf* no modelo *in vivo* de inflamação cutânea aguda induzido por TPA. siRNA na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo sem tratamento; **p<0,05 em relação ao grupo TPA; [#]p<0,05 em relação ao grupo TPA + NLC e, [$]p<0,05 em relação ao grupo TPA + NLC + siRNA controle. 93
Figura 39 - Efeito da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *Tnf* na normalização do aumento nos níveis do RNAm *Tnf* induzido por imiquimode no modelo *in vivo* de psoríase. siRNA na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo Vaselina + NLC; **p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC; ***p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC + siRNA controle. 95
Figura 40 - Medida da atividade da MPO para avaliação do efeito da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) incorporada com siRNA *Tnf* na redução do processo inflamatório induzido por imiquimode no modelo *in vivo* de psoríase. siRNA na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo Vaselina

+ NLC; **p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC; ***p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC + siRNA controle. 98
Figura 41 - Imagens representativas da pele de camundongos BALB/c tratadas diariamente com: A) Vaselina + NLC; B) Imiquimode + NLC; C) Imiquimode + NLC + siRNA controle; D) Imiquimode + NLC + siRNA *Tnf* após 5 dias de tratamento. Inflamação cutânea induzida pelo Imiquimode assemelha-se fenotipicamente à psoríase.....99
Figura 42 - Fotomicrografias representativas da pele dorsal de camundongos tratados 1x/dia com vaselina ou imiquimode e 2x/dia com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) isenta ou veiculando siRNA controle ou siRNA *Tnf*. siRNA na concentração final de 10 µM. Os cortes foram visualizados por microscopia de luz convencional utilizando a objetiva de 20X e 40X. 100
Figura 43 - Espessura da epiderme da pele dorsal de camundongos tratados 1x/dia com vaselina ou imiquimode e 2x/dia com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) isenta ou veiculando siRNA controle ou siRNA *Tnf*. siRNA na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo Vaselina + NLC; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC; $^{\$}$p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC + siRNA controle.....101
Figura 44 - Evolução temporal da [A] descamação, [B] rubor e [C] espessura da orelha dos animais tratados com Vaselina + NLC, Imiquimode + NLC, Imiquimode + NLC + siRNA controle e Imiquimode + NLC + siRNA *Tnf*. siRNA na concentração final de 10 µM. Os símbolos indicam a pontuação média (0 – 4) ou média da espessura da orelha ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada com os dados obtidos no último dia do experimento pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação aos grupos Vaselina + NLC, Imiquimode + NLC e Imiquimode + NLC + siRNA controle. 103
Figura 45 - Efeito da administração tópica (1x/dia) de vaselina ou imiquimode associado aos tratamentos (2x/dia) com a NLC isenta de siRNA e veiculando siRNA controle ou siRNA *Tnf* sobre os ataques de coceira espontânea em camundongos. siRNA na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo

Vaselina + NLC; #p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC; &p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC + siRNA controle. 105
Figura 46 - Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de secções de pele tratadas com imiquimode 1x/dia associado com o tratamento com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) veiculando siRNA controle ou siRNA controle-Alexa 647. As imagens representam a sobreposição máxima de secções ópticas *xy* em função da profundidade (*z*). Os cortes foram corados com DAPI para visualização do núcleo (azul). Lasers: UV (405 nm), emissão: 420 – 516 nm (azul); Visível (638 nm), emissão: 647 – 743 nm (vermelho). Objetiva 63X, barra: 50 µm. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tamanho de partícula, PdI e potencial zeta das NLCs preparadas com PEI ou OAM, sem e com siRNA 10 μM. 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Actb	Beta actina
Ago-2	Argonauta-2
AO	Ácido oleico
BSA	Albumina bovina sérica
cDNA	DNA complementar
Ct	*Cycle threshold*
d	Distâncias interplanares
D.O.	Densidade óptica
DAPI	4'6'-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGCR8	*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein*
DLS	*Dynamic Light Scattering*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
DOPE	1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
DOTMA	1,2-di-O-octadecil-3-trimetilamônio propano
DPBS	*Dulbecco's* tampão fosfato salino
dsRNA	*Double stand* RNA
EC	Estrato córneo
ECVAM	Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos
ELISA	*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
FA	Fase aquosa
FAM	Carboxifluoresceína
FDA	*Food and drug administration*
FE	Fator de empacotamento
GAGs	Glicosaminoglicanas
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio

H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL	Interleucina
IL-1α	Interleucina-1α
IL-6	Interleucina-6
IMQ	Imiquimode
IFN-γ	Interferon-gama
LPS	Lipopolissacarídeo
miRNA	microRNA
MO	Monoleína, monoleato de glicerila
MPO	Mieloperoxidase
MTT	[brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
Na_2EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético
Na_3PO_4	Fosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NLC	Nanodispersão líquido-cristalina
OAM	Oleilamina
PASI	Índice da Área e Severidade da Psoríase
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Paquioníquia congênita
PdI	Índice de polidispersão
PEI	Polietilenoimina
Pré-miRNA	microRNA precursor
Pri-miRNA	microRNA primário
qRT-PCR	Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real
RISC	RNA *Induced Silencing Complex*
RHE	Reconstructed Human Epidermis
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	Interferência por RNA
RNAm	RNA mensageiro
shRNA	*short hairpin* RNA
siRNA	*small interfering* RNA
TAE	Tris-acetato-EDTA

Th1	Linfócito T *helper,* tipo 1
Th17	Linfócito T *helper,* tipo 17
TLR-4	*Toll like-receptor* 4
TMB	3,3’,5,5’-tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol 13-acetato
UTRs	*Untranslated regions*

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas xi
Lista de abreviaturas e siglas xii

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Terapia Gênica – Interferência por RNA (RNAi) 1
1.2. Desafios e estratégias para veiculação de siRNAs 5
1.3. Cristais líquidos 12
1.4. Psoríase 18
1.5. Via de administração tópica para siRNAs 22

2. OBJETIVO 24
2.1 Objetivos específicos: 24

3. MATERIAL E MÉTODOS 25
3.1. Material 25
3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas: 25
3.1.2. Equipamentos e acessórios: 26
3.2. Métodos 27
3.2.1. Obtenção das nanodispersões líquido-cristalinas (NLCs) 27
3.2.2. Caracterização das NLCs 28
3.2.2.1. Análise do diâmetro médio e índice de polidispersão das partículas 28
3.2.2.2. Medida da carga superficial das partículas 29
3.2.3. Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pelas NLCs em fibroblastos por citometria de fluxo 29
3.2.3.1. Linhagem e cultivo celular 29

3.2.3.2. Tratamentos 30

3.2.3.3. Avaliação da captação celular do siRNA por citometria de fluxo.....30

3.2.4. Avaliação da estabilidade do complexo NLC/siRNA 30

3.2.5. Avaliação da irritação cutânea da NLC em modelo de pele humana reconstruída por MTT e quantificação de IL-1α.....31

3.2.5.1. Preparação dos tecidos.....32

3.2.5.2. Tratamentos 33

3.2.5.3. Avaliação da irritação cutânea por MTT 34

3.2.5.4. Avaliação da irritação cutânea por quantificação de IL-1α 35

3.2.6. Avaliação da eficácia do silenciamento da *IL6* em modelo de pele humana psoriática após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *IL6* 36

3.2.6.1. Preparação dos tecidos.....37

3.2.6.2. Tratamentos 37

3.2.6.3. Quantificação dos níveis extracelulares de IL-6 por ELISA.....38

3.2.6.4. Processamento dos tecidos para quantificação dos níveis do RNAm *IL6* por qRT-PCR.....39

3.2.6.4.1. Isolamento do RNA 39

3.2.6.4.2. Síntese do DNA complementar (cDNA) 41

3.2.6.4.3. Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR) 42

3.2.7. Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pela NLC em macrófagos por citometria de fluxo e por microscopia confocal de varredura a laser.....43

3.2.7.1. Linhagem e cultivo celular 43

3.2.7.2. Tratamentos 43

3.2.7.3. Avaliação da captação celular do siRNA por citometria de fluxo.....43

3.2.7.4. Avaliação da captação celular do siRNA por microscopia confocal de varredura a laser 44

3.2.8. Desenvolvimento de modelo *in vitro* de inflamação para avaliação da eficácia do tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf* 45

3.2.8.1. Avaliação da eficiência de complexação do siRNA *Tnf* em diferentes doses pela NLC 45

3.2.8.2. Linhagem celular e cultivo 45

3.2.8.3. Viabilidade celular 45

3.2.8.4. Indução in vitro da produção de TNF-α 46

3.2.8.5. Tratamentos 47

3.2.8.6. Avaliação da eficácia do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm *Tnf* por qRT-PCR 47

3.2.8.6.1. Isolamento do RNA 47

3.2.8.6.2. Síntese do cDNA 48

3.2.8.6.3. Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR) 49

3.2.9. Avaliação da eficácia do silenciamento do *Tnf* em modelo *in vivo* de inflamação aguda após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf* 50

3.2.9.1. Animais 50

3.2.9.2. Indução da inflamação cutânea aguda e esquema terapêutico 50

3.2.9.3. Avaliação da eficácia do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm *Tnf* por qRT-PCR 52

3.2.10. Avaliação da eficácia do silenciamento do *Tnf* em modelo *in vivo* de psoríase após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf* 53

3.2.10.1. Animais 53

3.2.10.2. Indução da psoríase e esquema terapêutico 53

3.2.10.3. Avaliação da eficácia do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm *Tnf* por qRT-PCR 54

3.2.10.4. Avaliação da eficácia anti-inflamatória do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC pela medida da atividade da mieloperoxidade (MPO) 55

3.2.10.5. Análises histológicas 55

3.2.10.6. Avaliação do efeito do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC no índice da área e severidade da psoríase (PASI) 56

3.2.10.7. Avaliação do efeito do siRNA *Tnf* veiculado sobre o comportamento de prurido espontâneo 56

3.2.11. Avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLC por microscopia confocal de varreadura a laser 57

3.2.12. Análise estatística 57

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 58

4.1. Obtenção e caracterização das NLCs 59

4.2. Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pelas NLCs em fibroblastos por citometria de fluxo 60

4.3. Avaliação da estabilidade do complexo NLC/siRNA 64

4.4. Avaliação da irritação cutânea da NLC em modelo de pele humana reconstruída por MTT e quantificação de IL-1α por ELISA 66

4.5. Avaliação da eficácia do silenciamento da *IL6* em modelo de pele humana psoriática após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *IL6* 72

4.6. Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pela NLC em macrófagos por citometria de fluxo e por microscopia confocal de varredura a laser 79

4.7. Desenvolvimento de modelo *in vitro* de inflamação para avaliação da eficácia do tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf* 81

4.7.1. Avaliação da eficiência de complexação de diferentes doses de siRNA *Tnf* pela NLC 82

4.7.2. Avaliação da citotoxicidade 82

4.7.3. Avaliação da eficácia do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm *Tnf* por qRT-PCR 83

4.8. Avaliação da eficácia do silenciamento do *Tnf* em modelo *in vivo* de inflamação aguda após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf* 92

4.9. Avaliação da eficácia do silenciamento do *Tnf* em modelo *in vivo* de psoríase após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf* 94

4.9.1. Avaliação da eficácia do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm *Tnf* por qRT-PCR 94

4.9.2. Avaliação da eficácia anti-inflamatória do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC pela medida da atividade da mieloperoxidade (MPO).....97

4.9.3. Análises histológicas 99

4.9.4. Avaliação do efeito do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC no PASI.....101

4.9.5. Avaliação do efeito do siRNA *Tnf* veiculado sobre o comportamento de prurido espontâneo.....104

4.10. Avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLC em modelo *in vivo* de psoríase por microscopia confocal de varreadura a laser.....106

5. CONCLUSÕES 109

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 111

Introdução

1. Introdução

1.1. Terapia Gênica – Interferência por RNA (RNAi)

Terapia gênica trata-se de um procedimento que envolve a introdução de material genético dentro da célula de um organismo, com o objetivo de manipular, substituir, suprimir ou introduzir genes para o tratamento de doenças. Os genes são responsáveis por uma grande parte das doenças humanas, seja pela ausência da codificação ou codificação em excesso de determinadas proteínas, codificação de proteínas anormais, ou ainda por deixar o organismo suscetível a agentes ambientais, o que os tornam alvos extremamente importantes para o tratamento das doenças. Desse modo, a terapia gênica surge como uma ferramenta promissora no desenvolvimento de novas terapias (VERMA; WEITZMAN, 2005; MARTIMPREY et al., 2009).

Neste contexto, destaca-se o mecanismo de interferência por RNA (RNAi), processo de silenciamento gênico pós-transcricional, descrito pela primeira vez no início da década de 90 pelos pesquisadores Richard Jorgenses e Joseph Mols, que tentavam intensificar a coloração púrpura de petúnias por meio da introdução de transgenes responsáveis pela pigmentação (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; VAN DER KROL et al., 1990). Entretanto, os resultados obtidos foram flores totalmente brancas ou irregularmente coloridas em decorrência do silenciamento, tanto do transgene, quanto do gene endógeno responsável pela pigmentação. Esse fenômeno foi denominado “co-supressão”. Mais tarde, um efeito semelhante foi encontrado no fungo *Neurospora crassa* e denominado "supressão" (“*quelling*”) (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; VAN DER KROL et al., 1990; FRANÇA et al., 2010; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011).

No mesmo período, Guo e Kemphues estudavam a função do gene *par-1* no nemátodo *Caenorhabditis elegans* utilizando fitas de RNA antisense e RNA sense (controle negativo) e observaram a inibição da produção da proteína par-1 com a utilização de ambas as fitas (GUO; KEMPHUES, 1995). Enquanto isso, Andrew Fire e Craig Mello obtiveram resultados similares aos de Guo e Kemphues com a injeção, separadamente, das fitas de RNA sense e antisense em nemátodos. Porém, observaram que a injeção de moléculas de RNA fita dupla (dsRNA, do inglês *double strand* RNA), resultava em efeitos mais pronunciados que cada fita individualmente na supressão da expressão de um determinado gene com sequência similar àquele dsRNA. Este processo no qual uma dupla fita de RNA era capaz de inibir a

expressão de um gene ficou conhecido como Interferência por RNA (RNAi) e laureou Andrew Fire e Craig Mello com o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina em 2006 (FIRE et al., 1998; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011).

A descoberta da RNAi em nemátodos possibilitou relacionar os fenômenos descritos como “co-supressão”, em plantas, e “supressão”, em fungos, ao processo de silenciamento desencadeado por dsRNA. A descoberta da RNAi em *C. elegans*, em 1998, juntamente com a descrição dos resultados das pesquisas de Tuschl e colaboradores, em 2001, no qual duplas fitas de 21 nucleotídeos de RNA sintéticas foram capazes de promover o silenciamento gênico em células de mamíferos (ELBASHIR et al., 2001), desencadearam uma revolução biotecnológica. A **Figura 1** ilustra o cronograma do desenvolvimento e aplicações da RNAi.

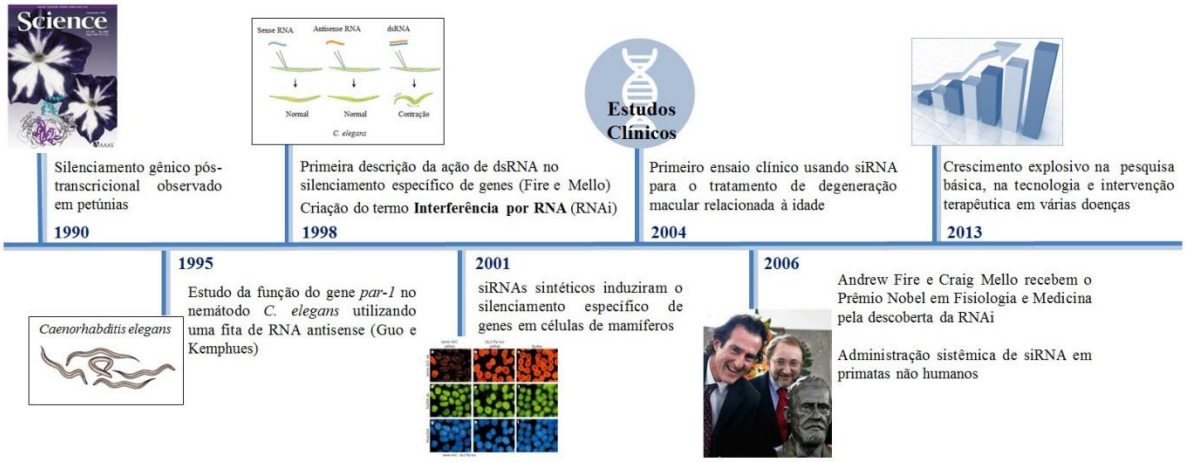


Figura 1 - Cronologia do desenvolvimento e aplicações da Interferência por RNA.

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

O mecanismo de interferência por RNA pode ser dividido em duas fases distintas: a fase de iniciação, na qual ocorre a geração das moléculas efetoras, as quais podem ser classificadas em relação a sua origem e função em ao menos três categorias: siRNA (*small interferig* RNA), miRNA (microRNA) e shRNA (*short hairpin*

RNA); e a fase de execução, na qual ocorre a incorporação das moléculas efetoras em complexos proteicos e a promoção do silenciamento gênico (GELEY; MÜLLER, 2004; DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007).

Os siRNAs são produtos de RNA dupla fita, com sequência totalmente complementar ao RNA mensageiro (RNAm) alvo e exógenos. Os miRNAs são produtos endógenos produzidos por meio de um processo envolvendo enzimas, proteínas nucleares e citoplasmáticas e apresentam característica de complementariedade parcial ao RNAm alvo. A produção dos miRNAs ocorre por meio da transcrição de genes pela RNA polimerase II em um microRNA primário (pri-miRNA) que então é clivado por um complexo proteico formado pela Drosha (enzima membro da família RNase III) e pela proteína DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein*) resultando no micro-RNA precursor (pré-miRNA), de aproximadamente 70 pares de bases, contendo uma região dupla fita e uma alça fita simples, formando uma estrutura denominada *hairpin.* O pré-miRNA é exportado para o citoplasma celular pela exportin-5. No citoplasma, é clivado pela enzima Dicer gerando um miRNA com cerca de 22 nucleotídeos. Os shRNA são moléculas de RNA dupla fita com estrutura semelhante à do miRNA. Podem ser sintéticos ou transcritos dentro da célula a partir de vetores que codificam o shRNA junto a um promotor da RNA polimerase III. Neste caso, o transcrito é processado pela Dicer igual os miRNAs (GELEY; MÜLLER, 2004; NOVINA; SHARP, 2004; DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007; FRANÇA et al., 2010; HUANG; LIU, 2011).

Após a geração das moléculas efetoras, estas são incorporadas a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC (RNA *Induced Silencing Complex*), do qual a proteína Argonauta 2 (Ago 2) participa. Essa proteína é responsável pela seleção da fita do siRNA ou miRNA que será incorporada ao complexo RISC e apresenta atividade de endonuclease dirigida contra a fita de RNAm alvo. A fita sense é eliminada e a fita antisense guia o complexo até o RNAm alvo. Como a sequência de bases nas moléculas de siRNA é perfeitamente complementar à sequência de bases do RNAm alvo, o complexo RISC cliva o referido RNAm, degradando-o. Por outro lado, dependendo da complementaridade das bases entre o miRNA e o RNAm, este pode ser degradado ou ter sua tradução bloqueada (**Figura 2**) (NOVINA; SHARP, 2004; DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; HUANG; LIU, 2011).

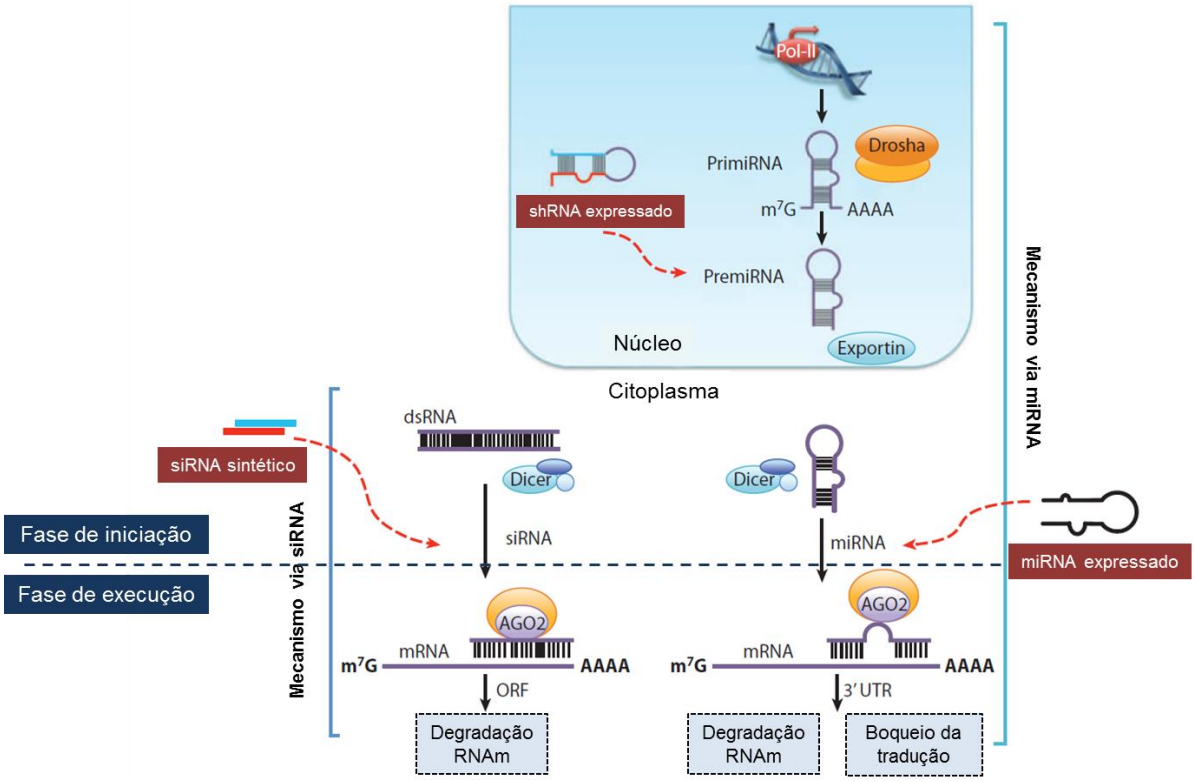


Figura 2 - Mecanismo de interferência por RNA. Adaptado de (HUANG; LIU, 2011).

O silenciamento gênico com a utilização de siRNAs criou um novo paradigma no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos em relação à terapêutica tradicional com o uso de pequenas moléculas e anticorpos monoclonais. Para projetar uma terapêutica com o uso de siRNA requere-se apenas o conhecimento da sequência do gene alvo de interesse. Além disto, pelo fato do mecanismo de RNAi mediado por siRNA ocorrer no citoplasma, temos uma potencial vantagem em relação a outros mecanismos de regulação gênica que necessitam da entrada da molécula efetora no núcleo celular (GUO et al., 2010b). Além disso, diferentemente dos fármacos convencionais, o siRNA é específico, ou seja, ocorre somente o bloqueio na produção da proteína de interesse, não afetando a produção de proteínas de estruturas moleculares semelhantes, o que reduz possíveis efeitos adversos. Seu uso também é mais efetivo, pois uma única molécula de siRNA pode silenciar várias cópias de RNAm, responsável pela produção de várias moléculas da proteína (DAKA; PEER, 2012).

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

estudos clínicos com o uso de siRNAs, pode-se destacar um relacionado à patologia cutânea paquioníquia congênita (PC), doença genética dominante negativa causada por mutação em genes que codificam a queratina (Clinical Trials.gov, 2016). Este é o primeiro estudo que utiliza uma molécula de siRNA em pele humana. Esta pesquisa clínica teve como objetivos avaliar a segurança e tolerabilidade de injeções intra-lesionais nos calos de pacientes portadores de PC conjuntamente à eficácia no tratamento com siRNA por meio de exames clínicos e relatos de pacientes (LEACHMAN et al., 2010).

1.2. Desafios e estratégias para veiculação de siRNAs

A eficácia do tratamento utilizando as moléculas de siRNA é considerada diretamente dependente da capacidade de transpor as barreiras que impedem sua absorção, distribuiçao e tráfego intracelular (KAPOOR; BURGESS; PATIL, 2012).

siRNAs são moléculas de RNA dupla fita estruturalmente bem definida. Possuem geralmente 19-21 pares de bases, sendo a extremidade 5' fosforilada e a extremidade 3' hidroxilada e com 2 nucleotídos desemparelhados em cada ponta (**Figura 3**). São macromoléculas hidrofílicas com elevado peso molecular (~ 13 kDa) e carregadas negativamente. Estas propriedades físico-químicas impedem sua difusão passiva através das membranas celulares que apresentam um residual de carga negativa (KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012; DENG et al., 2014; MARTÍNEZ; JIMÉNEZ; PAÑEDA, 2015).

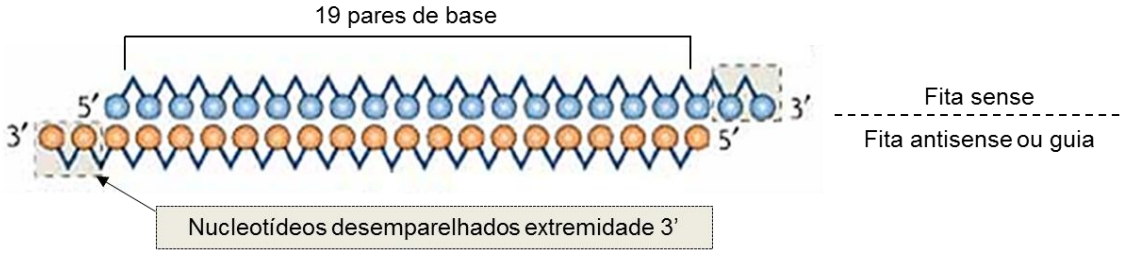


Figura 3 - Estrutura da molécula de siRNA. Adaptado de (DE FOUGEROLLES et al., 2007).

Outro obstáculo da terapêutica com siRNA está relacionado à estabilidade dessas moléculas em fluidos biológicos (KANASTY et al., 2012; GAO; HUANG, 2013; JOO et al., 2014; MARTÍNEZ; JIMÉNEZ; PAÑEDA, 2015). Quando veiculadas na forma livre, são quase instantaneamente degradadas pela ação de RNase A, que

resulta em uma curta meia-vida, de cerca de 30 min (KREBS; ALSBERG, 2011; ALIABADI et al., 2012). As estratégias utilizadas para melhorar a estabilidade do siRNA *in vivo* são: (i) modificações químicas nos grupamentos fosfodiéster, nos açucares ou no anel de ribose das bases nitrogenadas, que reduzem a especificidade da nuclease e, (ii) proteção física por meio de sistemas de liberação, que impedem o acesso da nuclease ao siRNA (ALIABADI et al., 2012; MARTÍNEZ; JIMÉNEZ; PAÑEDA, 2015).

As moléculas de siRNA também podem estimular uma resposta do sistema imunológico inato. Várias características podem influenciar a natureza e o grau de imunoestimulação e estas incluem a sequência do siRNA, sua estrutura, modificações químicas e os materiais utilizados na contrução dos sistemas de liberação (KANASTY et al., 2012).

Os siRNAs também podem apresentar efeito fora do alvo e afetar a expressão de outros genes. O silenciamento fora do alvo ou silenciamento não específico pode dificultar a interpretação de resultados experimentais e causar efeitos tóxicos. Dentre as possíveis causas do silenciamento não específico, podemos citar o reconhecimento de regiões não traduzidas (UTRs – do inglês *untranslated regions*) do RNAm pela fita guia de RNA e a seleção incorreta da fita de RNA pelo RISC. As sequências UTRs são compartilhadas por muitos RNAms e, devido a uma hibridação incompleta, moléculas de miRNA podem regular a expressão de vários genes. Como os siRNAs e miRNAs compartilham a mesma maquinaria celular, eventos de silenciamento gênico não específicos ocorridos pelo uso de siRNAs podem ser resultados da sua ação inespecífica pelo reconhecimento destas UTRs. Embora a homologia parcial com alguns UTRs seja inevitável, o uso de algoritmos de design para construção das moléculas de siRNA são utilizados para tentar selecionar sequências com o mínimo de complementaridade para estas regiões. Alternativamente, modificações químicas na estrutura do siRNA também são realizadas e objetivam desestabilizar a hibridação entre a sequência do siRNA com as regiões UTRs (KANASTY et al., 2012; DENG et al., 2014).

Considerando os obstáculos para utilização clínica do siRNA, além dos esforços para a produção de moléculas de siRNA mais estáveis, específicas e não imunogênicas, o desenvolvimento de sistemas de liberação é apontado como fator chave para sua utilização terapêutica (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; KREBS; ALSBERG, 2011).

Um sistema carreador ideal para veiculação de siRNA deve ser capaz de: i) ultrapassar as barreiras inerentes de cada via de administração como, por exemplo, o estrato córneo (EC) da pele, principal barreira para penetração de fármacos aplicados topicamente (CEVC; VIERL, 2010); ii) ligar-se às moléculas de siRNA promovendo proteção contra degradação enzimática; iii) facilitar a captação celular, uma vez que as moléculas de siRNA são incapazes de se difundirem passivamente pelas membranas celulares devido a repulsão eletrostática ocasionada pelo residual de carga negativa do siRNA e da bicamada lipídica; iv) promover o escape endossomal liberando o conteúdo do endossomo no citoplasma celular antes que ocorra a metabolização do siRNA pela ação dos lisossomos; v) ser inerte e não estimular uma resposta imunológica no organismo; e vi) liberar as moléculas de siRNA intactas no citoplasma para um eficiente silenciamento gênico (REISCHL; ZIMMER, 2009; PECOT et al., 2011; ZHANG; MCINTOSH; GRINSTAFF, 2012; FOLDVARI et al., 2015).

Os sistemas carreadores podem ser classificados em virais ou não-virais e são selecionados de acordo com sua segurança e biocompatibilidade para se obter uma elevada eficiência de transfecção gênica (REISCHL; ZIMMER, 2009).

Os vetores virais são conhecidos pela alta eficiência de transfecção de genes. São desenvolvidos por meio da modificação de vírus a fim de torná-los incapazes de se autorreplicar e de causar alguma doença, mas conservando sua capacidade inata de transferir o material genético para as células-alvo. Exemplos de vírus utilizados como carreadores incluem os lentivírus, adenovírus, herpes vírus, retrovírus e os vírus adeno-associados. Porém, devido a algumas características que incluem carcinogênese, imunogenicidade, limitada capacidade de carreamento gênico e dificuldade de produção em larga escala, atualmente, sua utilização é limitada (KAPOOR; BURGESS; PATIL, 2012; DENG et al., 2014; YIN et al., 2014).

Os carreadores não-virais foram desenvolvidos para oferecer alternativas aos vetores virais para veiculação de genes e são cuidadosamente formulados para evitar a estimulação do sistema imunológico, como também para ultrapassar as barreiras da absorção, distribuição e tráfego intracelular. Estes tipos de carreadores mostram-se bastante promissores devido sua segurança, possibilidade de direcionamento para diferentes alvos celulares por meio de modificações estruturais pela incorporação de ligantes e fácil síntese (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; GAO; HUANG, 2013; YIN et al., 2014; FOLDVARI et al., 2015).

Os siRNAs apresentam um residual de carga negativa, o que possibilita sua associação por meio de interações eletrostáticas à compostos carregados positivamente (por exemplo, polímeros e lipídios catiônicos, dendrímeros, petídeos e proteínas). Os siRNAs também podem ser conjugados com moléculas pequenas (por exemplo, colesterol) e anticorpos. Soma-se a essas alternativas, a possibilidade de veiculação do siRNA em nanopartículas (por exemplo, lipossomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, dentre outros), os quais apresentaram resultados promissores na promoção da captação celular e silenciamento gênico em diferentes linhagens celulares e tecidos (REISCHL; ZIMMER, 2009; WANG et al., 2010; GOODING et al., 2012; HONG; NAM, 2014; YIN et al., 2014; ZHOU; ZHANG; LIANG, 2014; FOLDVARI et al., 2015).

Dentre os polímeros carregados positivamente empregados na construção de carreadores não-virais, um dos protótipos utilizados é a polietilenoimina (PEI). O PEI é um polímero sintético hidrossolúvel com elevado residual de carga positiva em pH fisiológico devido aos grupamentos amino protonáveis em cada terceira posição (**Figura 4**) (GÜNTHER et al., 2011). Este polímero apresenta alta capacidade de se complexar com ácidos nucléicos por meio de interações eletrostáticas, promovendo a condensação da sua estrutura, com isso, diminui o seu tamanho e neutraliza a carga negativa, favorecendo a entrada na célula através da membrana celular (GUO et al., 2010b; KREBS; ALSBERG, 2011).

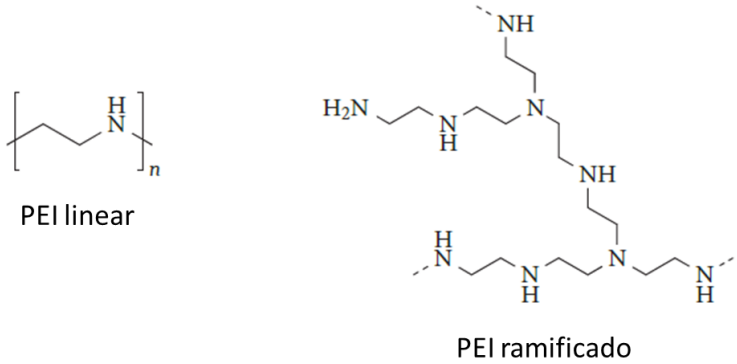


Figura 4 - Estrutura molecular do polímero catiônico PEI (YIN et al., 2014).

O polímero catiônico PEI encontra-se disponível com uma gama de pesos moleculares e na forma linear ou ramificada, sendo as formas ramificadas e de baixo peso molecular as mais indicadas para uma efetiva liberação intracelular. Estudos comparativos entre nanopartículas preparadas com PEI na forma linear ou

ramificada mostraram que a forma ramificada foi mais adequada, pois produziu partículas mais estáveis, carregadas positivamente, que promoveram uma alta captação celular do siRNA e resultaram em um silenciamento gênico mais efetivo (KWOK; HART, 2011).

Complexos formados entre o polímero catiônico PEI e o siRNA, denominados como *poliplexos*, e nanopartículas preparadas com esse polímero, devido ao residual de carga positiva, favorecem a interação com o exterior da membrana plasmática, o que conduz na sua internalização pelo processo de endocitose. A endocitose é um dos principais mecanismos de captação de substâncias pelas células e a liberação das substâncias dos endossomos para o citosol é uma etapa limitante para a obtenção de um silenciamento gênico eficiente (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010; BRUNO, 2011).

A liberação dos complexos siRNA/PEI ocorre no citoplasma após sofrerem o escape endossomal pelo mecanismo conhecido como “efeito esponja de prótons” (**Figura 5**). Esse mecanismo é mediado por agentes com alta capacidade de tamponamento quando protonado. A protonação induz um intenso influxo de íons e água para o interior do endossomo, ocasionando a ruptura da membrana endossomal, devido a um aumento da pressão osmótica, liberando o conteúdo internalizado (GUO et al., 2010b; HUANG; LIU, 2011).

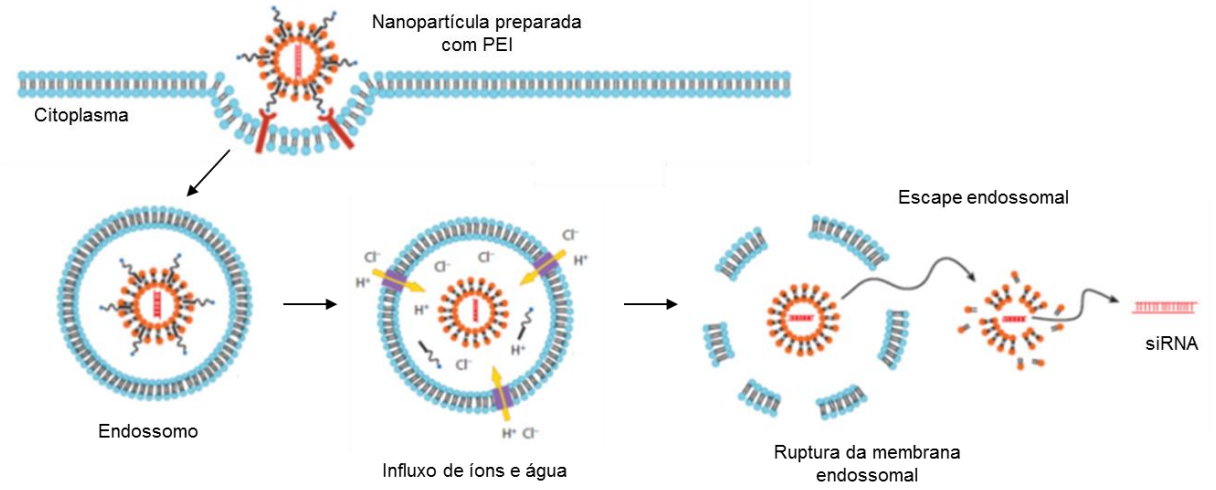


Figura 5 - Esquematização do mecanismo de escape endossomal de nanopartículas preparadas com PEI, conhecido como “efeito esponja de prótons”. Adaptado de (HUANG; LIU, 2011).

Ainda relacionado aos carreadores não-virais, vários sistemas com base lipídica foram desenvolvidos para veiculação de siRNA. Variações na composição dos lipídios e nas propriedades estruturais das nanopartículas permitem a entrega específica do siRNA, além de influenciar sua liberação após a internalização celular (KAPOOR; BURGESS; PATIL, 2012). Esses sistemas são tipicamente compostos por uma mistura de fosfolipídios e lipídios catiônicos que podem se organizar na forma de nanopartículas, ou apenas formar complexos com o siRNA, denominados como *lipoplexos*. Exemplos de lipídios catiônicos clássicos incluem o 1,2-di-O-octadecil-3-trimetilamônio propano (DOTMA) e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP). Também são utlizados lipídios neutros, conhecidos como lipídios auxiliadores, como, por exemplo, o 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), no preparo das nanopartículas para melhorar a citotoxicidade, por distribuir/mascarar as cargas positivas do lipídio catiônico. Além disso, o DOPE tem a capacidade de interagir com a membrana plasmática e formar fase hexagonal, aumentando a capacidade de escape endossomal da nanopartícula (FOLDVARI et al., 2015).

Estudos recentes mostraram o uso da monoleína (MO), uma anfifila bastante empregada na produção de formulações líquido-cristalinas, como um lipídio auxiliador no preparo de lipossomas para veiculação de DNA plasmidial, devido sua habilidade em fluidificar e estabilizar o lipossoma, mas também pelo fato de formar fase hexagonal e mediar o processo de fusão com a membrana endossomal (OLIVEIRA et al., 2014). Outro estudo mostrou a eficiência de estruturas não lamelares formadas por MO e DOTAP em induzir a fusão entre as nanopartículas e a membrana endossomal e, com isso, aumentar a eficiência do silenciamento gênico mediado por moléculas de siRNA (LEAL et al., 2010).

Estudos sugerem que a captação celular de nanopartículas lipídicas ou *lipoplexos* ocorre principalmente via endocitose. Porém, uma pequena fração pode entrar na célula por fusão com as membranas celulares num processo dependente de colesterol e pode ser responsável, em grande parte, pela degradação do RNAm (LU; LANGER; CHEN, 2009; BRUNO, 2011).

São propostos dois possíveis mecanismos de escape endossomal para as nanopartículas lipídicas; (i) por meio da interação das moléculas catiônicas da nanopartícula com a membrana aniônica do endossomo, ocorre a formação de pares iônicos, promovendo sua desestabilização e excluindo água da superfície da membrana, que resulta em seu rompimento (**Figura 6A**) e, (ii) por meio da formação

de fase hexagonal resultante do processo de fusão entre os lípidos catiônicos das nanoparticulas e os lípidos aniônicos na membrana do endossomo e, dessa forma, ocorre tanto a ruptura da membrana do endossomo quanto a ruptura da nanopartícula com a liberação de seu conteúdo (**Figura 6B**) (HUANG; LIU, 2011; FOLDVARI et al., 2015).

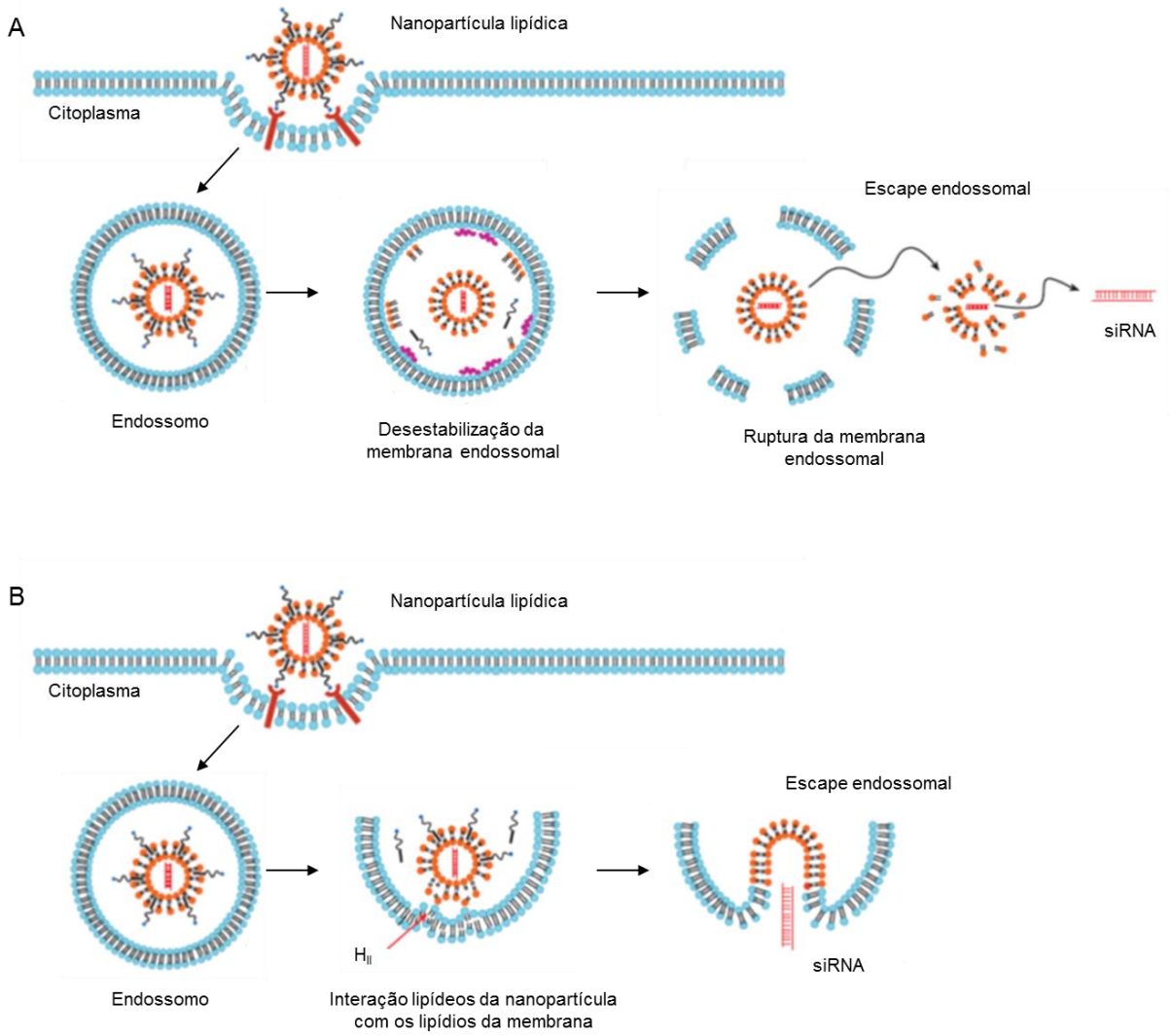


Figura 6 - Esquematização do mecanismo de escape endossomal de nanopartículas lipídicas por [A] desestabilização da membrana endossomal e por [B] formação de fase hexagonal. Adaptado de (HUANG; LIU, 2011).

O tamanho médio das nanopartículas é de grande importância para sua absorção celular. O tamanho de partícula adequado depende do seu campo de aplicação, por exemplo, para alcançar tumores, o menor diâmetro possível é desejado. Em geral, as partículas com diâmetro médio de até 500 nm podem ser captadas pelas células alvo por endocitose. Dessa forma, no desenvolvimento de

sistemas de liberação para siRNA, partículas nanométricas são requeridas (REISCHL; ZIMMER, 2009).

Além do adequado tamanho de partícula, estratégias que garantam proteção do siRNA contra a degradação enzimática, que promovam a captação celular e o escape endossomal, biodegradabilidade, estabilidade, segurança, fácil manipulação e baixos custos para produção são requeridas para a viabilização dessa promissora classe terapêutica (WU et al., 2014).

1.3. Cristais líquidos

Nas últimas décadas, sistemas líquido-cristalinos têm atraído grande atenção devido às suas aplicações em diversas áreas. O grande interesse nesses sistemas está na possibilidade de criar partículas estruturadas mediante o uso de métodos instantâneos e modular as forças formadas por meio de estímulos fisiológicos como pH, temperatura e força iônica (YAGHMUR; GLATTER, 2009; MILAK; ZIMMER, 2015).

Os cristais líquidos liotrópicos podem ser definidos como o estado da matéria intermediário entre o estado sólido cristalino e líquido isotrópico. A diferença entre líquidos e cristais sólidos é o estado de ordem; os cristais apresentam ordem posicional e orientacional, enquanto que nos líquidos as moléculas difundem-se livremente. Os cristais líquidos combinam a organização do estado sólido com a fluidez e mobilidade molecular do estado líquido. Podem ser obtidos por diversos tipos de moléculas que se autoagregam em um ambiente hidrofílico (SINGH, 2000).

Lipídios anfifílicos, tais como monoglicerídeos, fosfolipídios, lipídios à base de ureia e glicolipídios podem se auto-organizar espontaneamente em ambiente hidrofílico e formar fases líquido-cristalinas. No entanto, os monoglicerídeos insaturados são os mais estudados, em particular, o monoleato de glicerila, também conhecido como monoleína (MO) (PAN et al., 2013).

A MO (**Figura 7**) é composta por uma cadeia de hidrocarboneto ligada a um glicerol, através de uma ligação éster. Os grupos hidroxila, provenientes do glicerol, conferem à molécula características polares, enquanto a cadeia de hidrocarboneto (C 18), com uma dupla ligação *cis* na posição 9, 10, confere à molécula características apolares. Portanto, a MO é considerada uma molécula anfifílica. É atóxica, biodegradável e biocompatível, sendo classificada como segura e incluída na lista de ingredientes inativos do FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*)

(GANEM-QUINTANAR; QUINTANAR-GUERRERO; BURI, 2000; MILAK; ZIMMER, 2015).

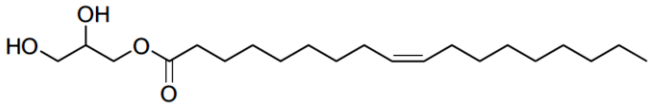


Figura 7 - Estrutura molecular da monoleína (PAN et al., 2013).

A formação das diferentes fases líquido-cristalinas ocorre com a hidratação das porções hidrofílicas da MO por um solvente hidrofílico, como a água, através de ligações de hidrogênio, enquanto as cadeias alifáticas se agregam com base em interações de van der Waals (GUO et al., 2010a; LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011).

Sistemas líquido-cristalinos são caracterizados por alta ordenação interna e simetria, com ampla área interfacial e também apresentam a capacidade de incorporar moléculas hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas e modular a liberação destas substâncias (LOPES et al., 2006b; GUO et al., 2010a; PAN et al., 2013; MILAK; ZIMMER, 2015). As fases líquido-cristalinas comumente encontradas são: lamelar, hexagonal e cúbica (**Figura 8**). A maioria das mesofases liotrópicas existe como pares simétricos, um “normal” (tipo I) onde os lipídios agregados encontram-se em uma matriz contínua de água, e um “invertido” ou “reverso” (tipo II) onde os grupos hidrofílicos hidratados encontram-se dispostos dentro de uma matriz apolar contínua composta pelas cadeias de hidrocarbonetos (LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011).

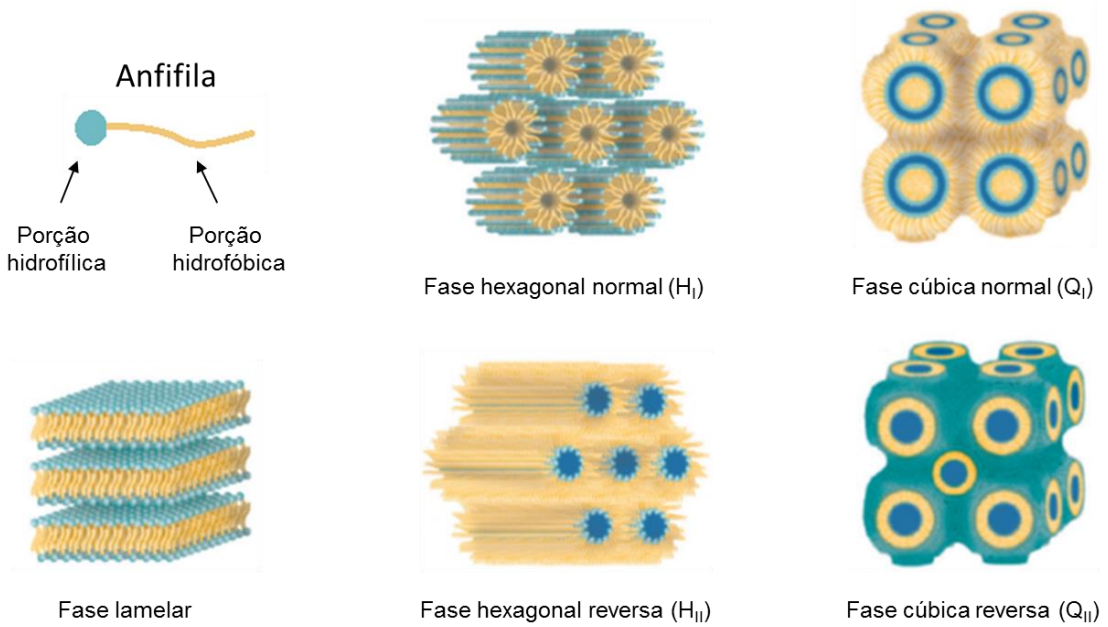


Figura 8 - Representação esquemática das diversas fases líquido-cristalinas formadas pela monoleína em presença de água. Adaptado de: ("Cubic Phase Particles in Drug Delivery", 2012).

A fase lamelar caracteriza-se por intercalar bicamadas lipídicas com a fase aquosa, nas quais os grupamentos polares das moléculas localizam-se adjacentes e projetados para a fase aquosa, enquanto as cadeias de hidrocarbonetos encontram-se dispostas paralelamente, formando uma rede unidimensional. Essa fase é caracterizada por sua fluidez e anisotropia na forma de mosaico planar e/ou cruzes de Malta (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2000; SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

A fase hexagonal é formada por longas estruturas cilíndricas, ocorrendo em duas formas: (i) a fase normal, onde a porção polar da anfifila localiza-se na região externa dos cilindros; e (ii) a fase reversa, formada por canais aquosos circundados pela porção polar da anfifila, com a porção apolar localizada ao redor dos cilindros. Sua obtenção torna-se possível pela adição de compostos apolares ao sistema, como por exemplo, o ácido oleico. O gel de fase hexagonal apresenta-se anisotrópico ao campo de luz polarizada, com textura estriada não geométrica ou em formato de placas; sua menor viscosidade em relação à fase cúbica é uma importante propriedade que facilita suas aplicações práticas (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2000; LIBSTER et al., 2009).

A fase cúbica é formada por uma bicamada lipídica curva e contínua (com uma espessura de aproximadamente 3,5 nm) que se estende em três dimensões,

separando dois canais congruentes de água de aproximadamente 5 nm, quando hidratado. O gel de fase cúbica apresenta-se transparente, bastante viscoso, isotrópico e termodinamicamente estável na presença de excesso de água (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001; GUO et al., 2010a).

A literatura relata diversos fatores que podem influenciar o comportamento das mesofases líquido-cristalinas. A adição de um terceiro componente ao sistema anfifila/água, como o ácido oleico, trioleína, monoleato de diglicerol, vitamina E, dentre outros, pode modular a textura das mesofases líquido-cristalinas e resultar em transição de fase. Variações de temperatura e pressão, concentração de sais, pH e aditivos também podem induzir a transição de fase nos sistemas líquido-cristalinos (LOPES et al., 2006a; PHAN et al., 2011; ROSSETTI et al., 2011; FONG; LE; DRUMMOND, 2012; CHEN; MA; GUI, 2014; ZABARA; MEZZENGA, 2014).

A influência desses fatores na formação das fases líquido-cristalinas pode ser avaliada com o uso de técnicas para a identificação das fases obtidas, sendo a microscopia de luz polarizada e a difração de raios X as mais utilizadas. A microscopia de luz polarizada é uma técnica bem estabelecida e baseia-se nas texturas das diferentes fases para sua identificação (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2000). A difração de raios X é uma técnica que emprega raios X para determinar distâncias repetitivas dentro de materiais sólido-cristalinos e em cristais líquidos. Através dos valores das distâncias interplanares, *d*, obtidos a partir lei de Bragg ($\lambda = 2d sen\theta$), a associação da razão entre essas distâncias aos índices de Miller da simetria da estrutura permite a identificação das diferentes fases líquido-cristalinas (DONG; BOYD, 2011).

A teoria do fator de empacotamento (FE) também é considerada uma ferramenta útil no estudo da influência da estrutura lipídica na formação das fases líquido-cristalinas, como também avalia a influência de outros parâmetros que afetam a curvatura polar-apolar e, consequentemente, a auto-organização dos componentes, pois relaciona matematicamente o volume da porção hidrofóbica (v), o comprimento da cadeia de hidrocarboneto (l) e a área da porção hidrofílica (a) através da equação:

$$FE = \frac{\mathrm{v}}{a.l}$$

A influência da alteração destas variáveis é demonstrada, resumidamente, na **Figura 9**.

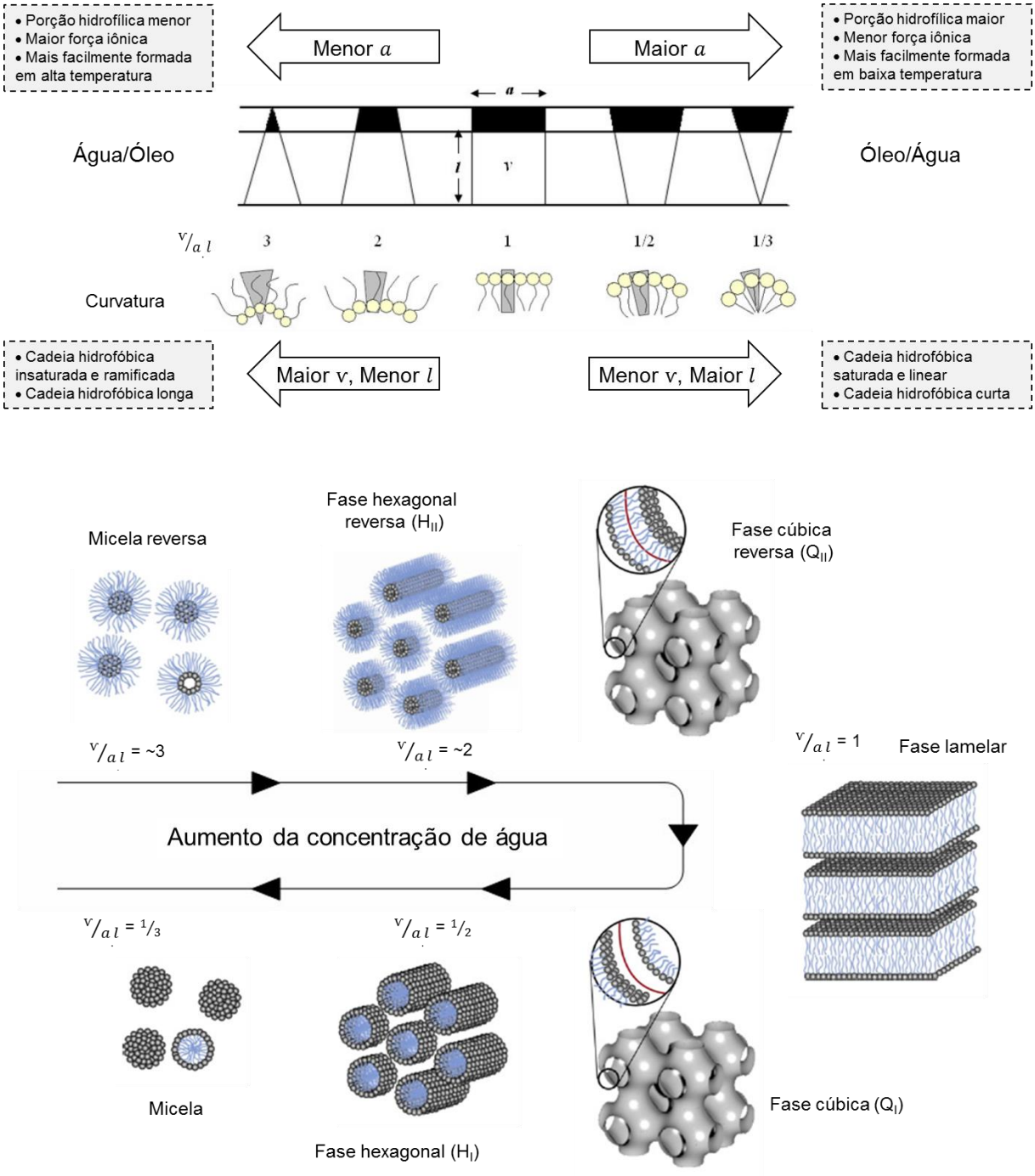


Figura 9 - Diagrama esquemático do impacto da estrutura lipídica, aumento da concentração de água e estímulos externos sobre o fator de empacotamento e curvatura. Adaptado de (NGUYEN, 2008; CHANG et al., 2015).

Um aumento em a pode ocorrer devido à hidratação ou repulsão eletrostática entre a porção polar de lipídios adjacentes. Por outro lado, o aumento de v, resulta

de um aumento no número e/ou tamanho das cadeias de hidrocarbonetos e também pode ocorrer devido ao aumento na fluidez da cadeia dos hidrocarbonetos em temperaturas elevadas. Quando o valor do fator de empacotamento é menor que 1, a anfifila se auto-organiza formando estruturas Tipo I, com curvatura positiva para água; quando FE é igual a 1, ocorre a formação de fase lamelar e; quando é maior que 1, há o rearranjo da anfifila, formado estruturas Tipo II, com curvatura negativa (GUO et al., 2010a; FONG; LE; DRUMMOND, 2012).

Alterações na curvatura e no empacotamento dos lipídios em resposta a fatores externos (por exemplo, temperatura) ou mudança de composição (por exemplo, teor de água) podem resultar em transições entre as fases reversas e fases normais, como ilustrado na **Figura 9**.

É importante ressaltar que alguns lipídios anfifílicos são capazes de absorver água até uma determinada quantidade e, a adição de água em excesso não resulta em transições de fase. Desse modo, fases líquido-cristalinas do tipo reversas podem coexistir em excesso de água e, então, serem dispersas para formar uma dispersão coloidal. A dispersão dos géis de fase cúbica e de fase hexagonal em água forma pequenas partículas denominadas “cubossomos” e “hexossomos”, respectivamente e, comumente, é realizada por técnicas de fragmentação como a homogeneização em alta pressão ou sonicação (SIEKMANN et al., 2002; LOPES et al., 2006a; GUO et al., 2010a; CHEN; MA; GUI, 2014).

Para evitar a reagregação das partículas dispersas, estabilizadores são adicionados. Dentre estes, destacam-se os copolímeros em bloco, que conferem estabilidade estérica auxiliando na manutenção da dispersão de partículas líquido-cristalinas; o tensoativo Pluronic F127® (conhecido comercialmente como Poloxamer 407® e Lutrol F127®) é o mais utilizado (AMAR-YULI et al., 2007; CHONG et al., 2011).

As dispersões são uma alternativa para as fases líquido-cristalinas na forma de gel, onde a dispersão reduz significativamente a viscosidade do sistema, facilitando sua aplicação e incluem vantagens como grande área superficial, estabilidade termodinâmica e possibilidade de serem incorporadas por outras formulações (LOPES et al., 2006a; AMAR-YULI et al., 2009; ZABARA; MEZZENGA, 2014; MILAK; ZIMMER, 2015).

Considerando-se a aplicação tópica, nanodispersões liquidas-cristalinas demonstraram capacidade de reduzir reversivelmente as propriedades de barreira

impostas pela pele, além de promover a penetração cutânea de macromoléculas e outros tipos de moléculas, conforme demostrado por trabalhos do grupo de pesquisa (LOPES et al., 2006a, 2006b; LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007; PRAÇA et al., 2012; PETRILLI et al., 2013, 2016; VICENTINI et al., 2013b; ROSSETTI et al., 2016). Além disso, estudos prévios do grupo, demonstraram a habilidade de uma nanodispersão líquido-cristalina de fase hexagonal, composta por MO, pelo promotor de absorção cutânea ácido oleico e o polímero catiônico PEI, em promover a liberação cutânea de siRNA e reduzir os níveis da proteína modelo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (VICENTINI et al., 2013b).

Simultaneamente a outros estudos reportados na literatura que também utilizaram sistemas à base de monoleína e adjuvantes catiônicos para a liberação funcional de siRNA (LEAL et al., 2010; ZHEN et al., 2012; BORGHETI-CARDOSO et al., 2014, 2015; PETRILLI et al., 2016), ressaltam-se a relevância e aplicabilidade de sistemas líquido-cristalinos para veiculação de siRNA na terapia gênica.

1.4. Psoríase

Psoríase é uma doença inflamatória crônica, imunomediada, que se manifesta na pele e/ou articulações e afeta 2-5% da população mundial (PRADHAN; SINGH; SINGH, 2013; RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014). Na pele, caracteriza-se por placas eritematosas, queratinócitos hiperproliferados e com diferenciação anormal, levando a hiperplasia da epiderme, infiltração de linfócitos T ativados e dilatação dos capilares sanguíneos (GEUSENS et al., 2009; JAKOBSEN et al., 2009). Está associada a significantes comorbidades, incluindo depressão, hipertensão, diabetes, dentre outras, e afeta a qualidade de vida dos pacientes devido ao desconforto físico, imagem negativa do corpo, limitações nas atividades diárias, contatos sociais, e de trabalho (LI; ARMSTRONG, 2012).

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

O diagnóstico da psoríase é baseado na apresentação clínica, necessitando eventualmente de biópsia da pele para confirmação. As alterações relevantes que são observadas na epiderme incluem a acantose (aumento do número de

queratinócitos e espessamento da camada espinhosa), perda da camada granular, paraceratose (disfunção do processo de cornificação que mantém queratinócitos nucleados na camada córnea) e hiperceratose (espessamento da camada córnea). Ao mesmo tempo, o aumento da quantidade e a dilatação de vasos sanguíneos na derme permitem a maior migração de células imunológicas aos locais afetados mantendo o ciclo da doença ativo (KRUEGER; BOWCOCK, 2005; SCHÖN; BOEHNCKE, 2005; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015).

Trata-se de uma doença etiológica multifatorial, na qual fatores genéticos e influências ambientais levam a uma disfunção imunocelular, responsável pelo quadro inflamatório característico, no qual citocinas e quimiocinas possuem um papel importante no recrutamento de linfócitos e na manutenção do processo inflamatório. A pele psoriática é também caracterizada por um aumento da angiogênese (SCHÖN; BOEHNCKE, 2005; SARRA et al., 2011).

A complexa imunopatogênese da psoríase envolve alterações tanto do sistema imunológico inato (queratinócitos, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células endoteliais), quanto do sistema imunológico adquirido (linfócitos T), mediada por citocinas, e inclui várias etapas pelas quais a pele pré-psoriática é convertida em uma placa psoriática após a ativação imunocítica. A formação das lesões características da psoríase incluem uma resposta do tecido angiogênico; recrutamento e acúmulo de células inflamatórias na derme, envolvendo grande população de células apresentadoras de antígeno (ex.: células dentríticas e macrófagos) e células T; e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para um ciclo vicioso de inflamação no interior das lesões cutâneas. Esses eventos culminam na remodelação da epiderme, com proliferação e diferenciação alterada dos queratinócitos (NICKOLOFF, 2007).

O evento inicial na psoríase envolve um gatilho, resultante de uma ação recíproca entre fatores ambientais e genéticos, que desencadeiam uma cascata inflamatória e imunológica. Queratinócitos liberam fatores que ativam as células dendríticas dérmicas, que por sua vez ativam as células T nos nódulos linfáticos. As células T, em seguida, diferenciam-se em células T *helper* Tipo 1 (Th1, produtoras de IFN-γ, TNF-α e IL-2) e T *helper* Tipo 17 (Th17, produtoras de IL-17, TNF-α, IL-6; IL-22) e migram de volta para a derme e epiderme, através de quimiocinas e moléculas de adesão. Em seguida, as células T ativadas ativam os macrófagos a liberarem diversas citocinas inflamatórias, incluindo TNF-α, IFN-γ, IL-17, IL-12 e IL-

23 que facilitam a proliferação de linfócitos Th1/Th17 e também levam a ativação e hiperproliferação de queratinócitos, manifestando-se clinicamente como placas psoriáticas (**Figura 10**) (NICKOLOFF, 2007; NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; LIMA; LIMA, 2011; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015).

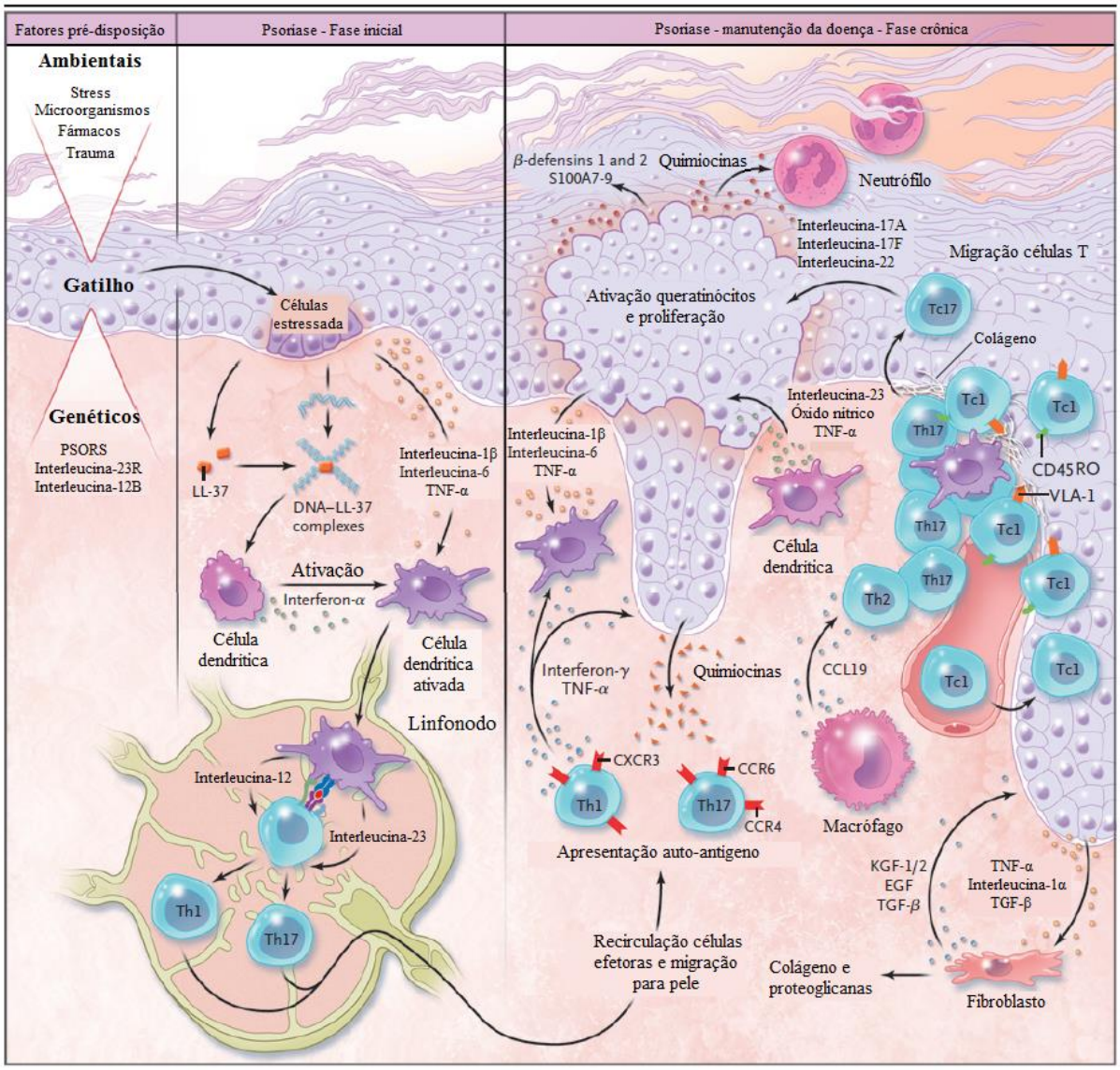


Figura 10 - Esquema evolutivo do quadro imunoinflamatório característico na psoríase. Adaptado de (NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009).

Tanto no início, quanto na exacerbação do quadro inflamatório da psoríase, as células dendríticas ativadas produzem, entre outros mediadores, o TNF-α, citocina pró-inflamatória capaz de ampliar a inflamação através de várias vias de sinalização. Pode ser produzida por uma grande variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, linfócitos, queratinócitos e células endoteliais e exerce sua

atividade induzindo a produção de mediadores secundários e moléculas de adesão que facilitam a interação e migração de células T em direção à epiderme (SCHÖN; BOEHNCKE, 2005; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015).

A escolha terapêutica para o tratamento da psoríase é realizada com base na gravidade da doença. Aproximadamente 70-80% dos pacientes utilizam a terapia tópica com análogos da vitamina D_3 (calcipotriol, calcitriol e tacalcitol) e retinóicos em associação aos corticoesteróides. Nos casos de psoríase moderada a severa, recomenda-se a terapia sistêmica com agentes imunossupressores e quimioterápicos (ciclosporina, metotrexato e retinóides), associada à terapia tópica e fototerapia (SCHÖN; BOEHNCKE, 2005; BERTH-JONES, 2013; BOEHNCKE; SCHÖN, 2015).

Embora a maioria dos regimes terapêuticos estabelecidos seja razoavelmente eficaz como terapia de curto prazo para psoríase, devido ao perfil de segurança desses fármacos, seu uso por um logo prazo é limitado, o que dificulta o controle da doença (SCHÖN; BOEHNCKE, 2005).

Os recentes avanços nos estudos da psoríase forneceram subsídios para a concepção de novos agentes biológicos modificadores da resposta imunoinflamatória através da sua ação nos mecanismos-chave da patogênese da psoríase. Dentre eles, destacam-se os anticorpos monoclonais (adalimumabe, infliximabe) e proteína de fusão (etanercepte) antagonistas de TNF-α e moduladores da diferenciação de linfócitos mediada por IL-12 e IL-23 (ustekinumabe). Porém, apresentam desvantagens, que incluem a via de administração, propriedades imunossupressoras e elevado custo, sendo atualmente utilizados somente em casos graves e quando os demais tratamentos não são adequados (NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009; BERTH-JONES, 2013; CHI; WANG, 2014).

Os tratamentos atuais para a psoríase são frequentemente associados à eficácia limitada e problemas relacionados à toxicidade, imunossupressão, dentre outros. Dessa forma, estudos estão sendo conduzidos no desenvolvimento de novas estratégias, buscando melhorar a relação risco-benefício dos corticóides e dos fármacos tradicionalmente empregados no tratamento da psoríase. Além disso, esforços estão sendo feitos no desenvolvimento de nanopartículas para aplicações dermatológicas, com o propósito de proporcionar uma libertação sustentada dos fármacos por um período prolongado de tempo, reduzir a toxicidade e aumentar a adesão do paciente ao tratamento (AGRAWAL; PETKAR; SAWANT, 2010; RAUT;

PRABHU; PATRAVALE, 2013; PINTO et al., 2014; PRADHAN; SINGH; SINGH, 2015).

Dentre as propostas terapêuticas para a psoríase, a normalização dos níveis das citocinas inflamatórias tem demonstrado melhoras no fenótipo da doença sendo que vários inibidores do TNF-α têm sido propostos, dentre eles, a terapia gênica com o uso de siRNAs (JAKOBSEN et al., 2009; BAK; MIKKELSEN, 2010; BRACKE et al., 2013; DESAI et al., 2013; MAREPALLY et al., 2014; PETRILLI et al., 2016).

1.5. Via de administração tópica para siRNAs

A pele é uma atrativa e importante via para a liberação de fármacos, uma vez que permite uma aplicação terapêutica não invasiva e em uma ampla região corpórea. Além da possibilidade do seu direcionamento para as doenças cutâneas (administração tópica), também é possível a obtenção de efeitos sistêmicos (administração transdérmica), combinando fatores como a comodidade do paciente, a ausência do metabolismo hepático e a eliminação de possíveis efeitos colaterais da administração sistêmica (PRAUSNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004).

O estudo da aplicação de siRNAs para o tratamento de doenças cutâneas tem obtido avanços importantes na elucidação de potenciais alvos moleculares e no desenvolvimento farmacotécnico de sistemas de liberação para uma entrega funcional dessas moléculas nas células alvo (VICENTINI et al., 2013a, 2013b).

Doenças cutâneas relacionadas a reações inflamatórias (vitiligo, psoríase e dermatite atópica), ao comportamento anormal das células (carcinoma espinocelular e melanoma), dano (queimadura e ferida) e doenças de pele monogênicas (paquioníquia congênita) são de grande interesse para a terapia com siRNAs, pois apresentam alvos moleculares bem definidos que podem ser silenciados, resultando em benefícios terapêuticos (THANIK et al., 2007; HICKERSON et al., 2008; TRAN et al., 2008; JAKOBSEN et al., 2009; KIGASAWA et al., 2010).

Para o estabelecimento de uma terapia eficaz utilizando siRNAs via administração tópica, primeiramente, é necessária a liberação eficiente do siRNA nas células alvo-específicas. No entanto, atingir esses alvos constitui um grande obstáculo para viabilização dessa terapêutica, uma vez qua a pele apresenta uma forte barreira exercida pelo EC, que dificulta a penetração de substâncias administradas topicamente. Além disso, os siRNAs, por serem macromoléculas hidrofílicas, não conseguem atravessar a pele por difusão passiva (DE

FOUGEROLLES, 2008; GEUSENS et al., 2011; ZAKREWSKY; KUMAR; MITRAGOTRI, 2015; DESMET et al., 2016).

As principais estratégias para a liberação de siRNAs na pele incluem o uso de formulações (lipossomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, peptídeos, dentre outras), métodos químicos (promotores de absorção cutânea) e os métodos físicos (iontoforese, sonoforese, microagulhas, eletroporação, dentre outrosw) com a finalidade de reduzir as propriedades de barreira da pele, promover a penetração cutânea e a utilização dessa macromolécula no tratamento de doenças de pele (PAUDEL et al., 2010; GEUSENS et al., 2011; VICENTINI et al., 2013a; ZAKREWSKY; KUMAR; MITRAGOTRI, 2015).

Nesse contexto, a presente pesquisa propôs a avaliação de um sistema de liberação tópica, nanoestruturado, a base de cristais líquidos, formado por lipídios com habilidade de promover a absorção cutânea, e por adjuvantes catiônicos capazes de complexarem o siRNA por atração eletrostática, como uma nova proposta para veiculação tópica de siRNAs na terapia da psoríase.

Objetivo

2. Objetivo

A presente pesquisa visou a obtenção, a caracterização e a avaliação da aplicação tópica, em modelos *in vitro* e *in vivo,* de nanodispersões líquido-cristalinas (NLCs) como sistema de liberação de siRNAs na terapia gênica da psoríase.

2.1 Objetivos específicos:

- Obtenção e caracterização das NLCs;
- Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pelas NLCs em fibroblastos;
- Avaliação da estabilidade do complexo NLC/siRNA;
- Avaliação da irritação cutânea da NLC em modelo de pele humana reconstruída;
- Avaliação da eficácia do silenciamento da *IL6* em modelo de pele humana psoriática após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *IL6*;
- Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pela NLC em macrófagos;
- Avaliação da eficácia do silenciamento do *Tnf* em modelo *in vitro* de inflamação após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf*;
- Avaliação da eficácia do silenciamento do *Tnf* em modelo *in vivo* de inflamação aguda após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf*;
- Avaliação da eficácia do silenciamento do *Tnf* em modelo *in vivo* de psoríase após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf*;
- Avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLC em modelo *in vivo* de psoríase.

Material e métodos

3. Material e métodos

3.1. Material

3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas:

A monoleína (Myverol 18-99®) foi fornecida pela Quest (Norwich, NY, USA). Os reagentes: albumina sérica bovina (BSA), (3-aminopropil) trietoxisilano, [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), 12-O-tetradecanoil-forbol 13-acetato (TPA), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), ácido oleico (AO), brometo de etídio, brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), cloreto de sódio (NaCl), 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), dietilpirocarbonato (DEPC), EDTA, fluoromount, glicina, iodeto de propídio, lipopolissacarídeo de Escherichia coli 0127:B8 (LPS), oleilamina (OAM), paraforlmadeído, Paraplast®, polietilenoimina (PEI), Poloxamer 407, poly-L-lisina, sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na_2EDTA), solução de antibiótico e antimicótico composto por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL, tripsina-EDTA (0,25%) e Triton X-100 foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). O creme depilatório Veet foi adquido da Veet® Brazil ceras e produtos depilatórios. Dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, ácido sulfúrico (H_2SO_4), fosfato monossódico, fosfato dissódico, fosfato de sódio (Na_3PO_4) e xilol foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil). O meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e o soro bovino fetal foram adquiridos da Gibco® (Carlsbad, CA, USA). Os reagentes: água livre de RNase, *Dulbecco's* tampão fosfato salino (DPBS), Faloidina/Texas red, IL-1α ELISA kit ELISA, IL-6 ELISA kit ELISA, Lipofectamina 2000 e UltraPure™ Agarose foram adquiridos da Invitrogen (Camarillo, CA, USA). A epiderme humana reconstruída EpiDerm™ (Epi-200) e o modelo de pele humana reconstruída psoriática - SOR-300-FT foram adquiridas da MatTek Corporation (Ashland, MA, EUA). Os fibroblastos da linhagem L929 (ATCC® CCL-1™) e os macrófagos da linhagem J774 (ATCC® TIB-67™) foram adquidos da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA). A heparina sódica (5000 U.I./mL) Hepamax-S® foi adquirida da Blausiegel (Cotia, SP, Brasil). O kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit,* siRNA controle - Silencer Negative Control #1 siRNA (#AM4635) sintetizado pela Ambion®, siRNA *IL6* (Silencer® Select Validated siRNA) sintetizado pela Ambion®, siRNA *Tnf* (Silencer® Select Pre-designed siRNA) sintetizado pela Ambion®, siRNA-FAM - Silencer 6-carboxyfluorescein (FAM) *Gapdh* siRNA (#AM4650) sintetizado pela Ambion® e o RNA*later*® Stabilization Solution

foram adquiridos da Applied Biosystems (Austin, TX, USA). Os *primers GAPDH* (Hs02758991_g1) e *IL6* (Hs01075666_m1) TaqMan® Gene Expression Assay foram adquiridos da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Os *primers Gapdh* (Mn.PT.39a.1), *Tnf* (Mn.PT.58.12575861) e *Actb* (Mm.PT.58.28904620.g) foram adquiridos da *Integrated DNA Technologies* (IDT, Coralville, Iowa, USA). O imiquimode creme 5% (Modik) foi adquirido da Germed (Fabricado por EMS S/A. Hortolândia, SP, Brasil). O isoflurano foi adquirido da Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda. (Itapita, SP, Brasil. O LightCycler® 480 Probes Master foi adquirido da Roche (Salt Lake City, UT, USA). A RNase A, o RNeasy Mini Kit e siRNA controle Alexa Fluor 647 foram adquidos da Qiagen (Germantown, MD, USA). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o tris(hidroximetil) aminometano foram adquiridos PA EMSURE MERCK (Darmstadt, Germany). O Tissue-Tec® O.C.T. Compound foi adquirido da Sakura Finetek (Torrance, CA, USA). A vaselina foi adquirida da Unilever Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

3.1.2. Equipamentos e acessórios:

- Agitador mecânico tipo mixer – IKA® (Campinas, SP, Brasil)
- Balança Analítica – Acculab (Arvada, CO, USA)
- Banho termostatizado Fanem (Guarulhos, SP, Brasil)
- Centrífuga Heraeus Megafuge 16R – Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
- Criostato Leica CM1850 – Leica Biosystems Inc. (Buffalo Grove, IL, USA)
- FACSCalibur e CellQuestPro software – BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
- Filmadora Sony Handycam DCR-PJ6
- Homogeneizador de tecido Tissue Tearor™ – Biospec Products (Bartlesville, OK, USA)
- Homogeneizador ultrasônico Sonopuls modelo HD2270 – Bandelin (Berlin, Germany)
- Leitor de placa Synergy 2 – BioTek Instruments (Winooski, VT, USA)
- Medidor de pH – Digimed (São Paulo, SP, Brasil)
- Microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP8 – Leica Microsystems Inc (Buffalo Grove, IL, USA).
- Microscópio de fluorescência/óptico modelo Axio Imager.A1 – Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) com software analisador de imagem modelo AxioVision – Carl Zeiss (Oberkochen, Germany)

- Micrótomo rotativo manual 820 Spencer Microtome – AO® American Optical (Buffalo, NY, USA)
- NanoDrop 2000 – Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
- Paquímetro digital Satarrett® 799 (Athol, MA, USA)
- Sistema de fotodocumentação L-Pix EX – Loccus Biotecnologia (Cotia, SP, Brasil) equipado com o software L-PixImage
- Termociclador Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler – Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
- Termociclador LightCycler® 480 – Roche (Salt Lake City, UT, USA)
- Termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System - Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
- Termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler – Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
- Zetasizer Nano ZS – Malvern Instruments (Worcestershire, RU)

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção das nanodispersões líquido-cristalinas (NLCs)

As NLCs propostas para realização dessa pesquisa foram desenvolvidas no projeto de mestrado intitulado “Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica à base de cristais líquidos para veiculação de siRNA na terapia gênica”, processo Fapesp n° 2010/02398-3 e apresentaram resultados promissores para seu uso como sistema carreador de siRNA no tratamento de doenças cutâneas.

Para o preparo das NLCs compostas por monoleína (MO):fase aquosa (FA) (10:90, p/p) e MO:ácido oleico (AO):FA (8:2:90, p/p), foi empregado o método proposto por Lopes e colaboradores (2006) (LOPES et al., 2006a). Resumidamente, a MO foi aquecida em banho termostatizado até a temperatura de fusão (42 ºC) e, em seguida, misturada ao AO. Após a homogeneização da mistura, foi adicionada a FA composta por tampão Tris-HCl, 0,1 M, pH 6,5, contendo 1,5% de Poloxamer 407. A FA foi preparada com água livre de RNAse (água com dietilpirocarbonato – água DEPC).

O lipídio catiônico oleilamina (OAM) ou o polímero catiônico polietilenoimina (PEI) foram adicionados ao sistema MO:FA na concentração de 0,4% e ao sistema MO:AO:FA na concentração de 2,5 e 1,0%, respectivamente. Estes adjuvantes

catiônicos foram adicionados às fases lipídicas dos sistemas, homogeneizados por 2 min e, em seguida, foi adicionada a FA. Os sistemas foram deixados em repouso por 24 h após o preparo e acondicionados ao abrigo da luz. Após esse período, foram agitados em agitador do tipo "vórtex" por 2 min e então dispersos sob-banho de gelo em sonicador de haste, potência 16-18 Watts, por 4 min. O siRNA foi adicionado às NLCs e, após 30 min, os complexos NLC/siRNA estavam estabelecidos e prontos para o uso nos estudos seguintes (**Figura 11**).

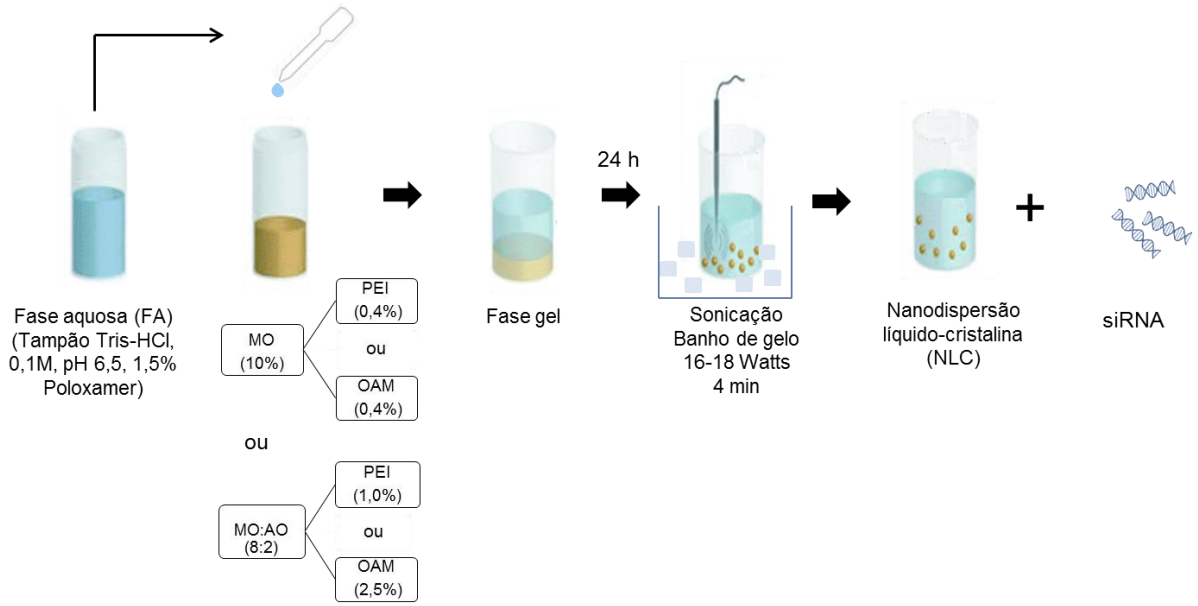


Figura 11 - Método para obtenção das NLCs compostas por MO:FA (10:90, p/p) e MO:AO:FA (8:2:90, p/p) incorporadas com os adjuvantes catiônicos PEI ou OAM. O siRNA foi adicionado às NLCs após o processo de sonicação.

3.2.2. Caracterização das NLCs

3.2.2.1. Análise do diâmetro médio e índice de polidispersão das partículas

Foi utilizada a técnica de espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering - DLS*) para a análise do diâmentro médio e distribuição de tamanho das partículas. As NLCs isentas ou contendo siRNA controle (10 µM) foram diluídas em água Milli-Q (1:100, v/v) e submetidas às análises no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, RU). As amostras foram colocadas em cubetas de poliestireno de 1 cm de caminho óptico e as medições foram realizadas a 25 ºC. O equipamento possui um lazer de HeNe de 4 mW operando num comprimento de onda de 633 nm e realiza as medições não invasivas por

retroespalhamento de luz sob um ângulo de detecção de 173º. As análises foram realizadas em triplicata.

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

3.2.2.2. Medida da carga superficial das partículas

A carga superficial das NLCs foi medida como potencial zeta, o qual é determinado pela mobilidade eletroforética das partículas/gotículas dispersas submetidas a um campo elétrico. As NLCs isentas ou contendo siRNA controle (10 µM) foram diluídas em água Milli-Q (1:50, v/v) e submetidas às análises no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, RU). As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3. Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pelas NLCs em fibroblastos por citometria de fluxo

3.2.3.1. Linhagem e cultivo celular

Os ensaios de captação celular foram realizados em cultura celular de fibroblastos da linhagem L929 (ATCC® CCL-1™, *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA). As células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 1% (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico composto por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado. Foram incubadas a 37 ºC com 5% de CO_2. As células foram subcultivadas a cada 5-7 dias, usando PBS 1X para lavá-las e tripsina-EDTA 0,25% (g/v) para removê-las da garrafa de cultivo celular. Após a remoção, as células foram submetidas à centrifugação (129 x *g,* por 10 min a 4 °C), ressuspendidas no meio de cultivo e, para contagem das células foi utilizada a câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas a uma densidade de $6x10^5$ células/poço em placas de 12 poços para os ensaios de captação celular.

3.2.3.2. Tratamentos

As NLCs contendo siRNA marcado com carboxifluoresceína (FAM) (siRNA-FAM) 10 µM foram diluídas em PBS (1:50, v/v). 100 µL de cada diluição foram utilizados no ensaio de captação celular que resulta em uma concentração final de siRNA por poço de 20 nM (20 pmol siRNA/6x10^5 células/mL de meio de cultura). A diluição das formulações utilizada foi previamente padronizada e garante uma alta viabilidade celular (~ 92%) (DEPIERI, 2012). Células sem tratamento, solução de siRNA-FAM (10 µM) em água livre de RNase e complexos formados entre os adjuvantes utilizados no preparo das formulações com siRNA-FAM foram utilizados como controles.

Após 24 h do plaqueamento celular, o meio de cultura foi renovado, as células foram tratadas com as formulações e reincubadas por 24 h a 37 ºC com 5% CO_2. Após o tratamento, as células foram processadas para a avaliação da captação celular das moléculas de siRNA.

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

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspendidas em meio de cultura. As células foram analizadas com FACSCalibur e CellQuestPro software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

A taxa captação celular do siRNA foi quantificada pela porcentagem de células positivas para o fluorocrômo FAM medida pelo canal FL1, sendo as células mortas excluídas da análise pela marcação com iodeto de propídio (50 µg/mL). Foram coletados 10.000 eventos por amostra analisada.

3.2.4. Avaliação da estabilidade do complexo NLC/siRNA

Após selecionada a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) para os estudos seguintes, o próximo passo foi avaliar a estabilidade do complexo NLC/siRNA por meio do ensaio de integridade, devido a importância de liberar o siRNA íntegro do sistema carreador no interior celular para um efetivo silenciamento gênico (BRUNNER; COHEN; MONSONEGO, 2010) e, por meio do ensaio de degradação enzimática, devido a importância do sistema carreador em proteger o siRNA contra a degradação (LU; LIU; QI, 2011).

Para avaliar a integridade do siRNA após sua complexação com a NLC foi utilizado um ensaio de competição polianiônica com a heparina (SHEN et al., 2011).

40 µL da NLC complexada com siRNA (10 µM) foram tratados com 10 µL de heparina (5000 U.I./mL) durante 1 h a 37 °C para desfazer os complexos. Solução de siRNA em água livre de RNase (10 µM) e NLC sem siRNA foram utilizados como controles.

Para avaliar a habilidade da NLC em proteger o siRNA da degradação enzimática, 30 µL da NLC complexada com siRNA (10 µM) foram incubados com 0,2 µg de RNase A for 24 h a 37 °C. Após esse período, as amostras foram colocadas em banho termostatizado a 60 °C por 1 h para desnaturação da RNase A. Em seguida, foram adicionados 7,5 µL de heparina (5000 U.I./mL) durante 1 h a 37 °C para desfazer os complexos. Solução de siRNA em água livre de RNase (10 µM) e NLC sem siRNA foram utilizados como controles.

As amostras foram analisadas em gel de agarose 2% preparado com tampão Tris-Acetato-EDTA pH=8,0 (TAE) e corado com brometo de etídio (10 mg/mL). Para as análises, as amostras foram preparadas com a adição de *loading buffer*, utilizado para conferir densidade à amostra, composto por: azul de bromofenol (0,25 %, p/v), xileno cianol FF (0,25 %, p/v), orange G (0,25 %, p/v), Tris-HCl pH 7,5 (10 mmol/L), EDTA (10 mmol/L) e sacarose (0,65 %, p/v), na proporção 4:1 (amostra: *loading buffer*). As amostras foram homogeneizadas e aplicadas no gel.

As corridas eletroforéticas foram processadas em cuba horizontal contendo tampão TAE, sob uma voltagem de 100 V, durante 20 min. Os géis, corados com brometo de etídio, foram visualizados sob-luz ultravioleta. Para obtenção das imagens utilizou-se o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) equipado com o software L-PixImage.

3.2.5. Avaliação da irritação cutânea da NLC em modelo de pele humana reconstruída por MTT e quantificação de IL-1α

Os avanços na engenharia de tecidos permitiram o desenvolvimento e obtenção de peles que podem reproduzir aspectos estruturais e funcionais da pele humana. Além da utilização em enxertos, estes tecidos também têm sido utilizados como modelos *in vitro* para avaliar a irritação cutânea de substâncias e como modelos de doenças para a avaliação de novos fármacos e sistemas de liberação (GROEBER et al., 2011; FLATEN et al., 2015). Epiderme humana reconstruída (RHE – do inglês *Reconstructed Human Epidermis*) é constituída por um único tipo celular, os queratinócitos, que são cultivados em *inserts* de cultura celular e é usada para

avaliar o risco de substâncias ou formulações aplicadas topicamente (GROEBER et al., 2011; MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014; DEPIERI et al., 2015). Neste estudo, a avaliação do potencial de irritação da NLC foi realizada utilizando o modelo de epiderme EpiDerm™ (Epi-200, MatTek Corporation, Ashland, MA, EUA).

Estes tecidos exibem características morfológicas e de crescimento semelhantes à pele *in vivo* e são uniformes e reprodutivos. EpiDerm™ consiste em camadas organizadas (basal, espinhosa, granular) e em camadas cornificadas análogas àquelas encontradas *in vivo*. Também é mitoticamente e metabolicamente ativo e reproduz muitas das propriedades da função de barreira da pele humana normal (MatTek, 2016).

3.2.5.1. Preparação dos tecidos

Os *inserts* contendo os tecidos encontravam-se imersos em uma matriz de agarose em uma placa de 24 poços e foram mantidos refrigerados (2 - 8 °C) até o momento do experimento.

Em condições estéreis, a embalagem com a placa de 24 poços foi aberta e os *inserts* foram retirados cuidadosamente da agarose e, com o auxílio de uma gaze, a agarose aderida ao *insert* foi removida. Os *inserts* foram colocados em placas de 6 poços contendo 900 µL de meio de cultura pré-aquecido a 37 °C de maneira que todo o tecido estivesse em contato com o meio de cultura (sem bolhas de ar abaixo do *insert*) (**Figura 12**). As placas foram incubadas a 37 ºC com 5% de CO_2 *overnight*.

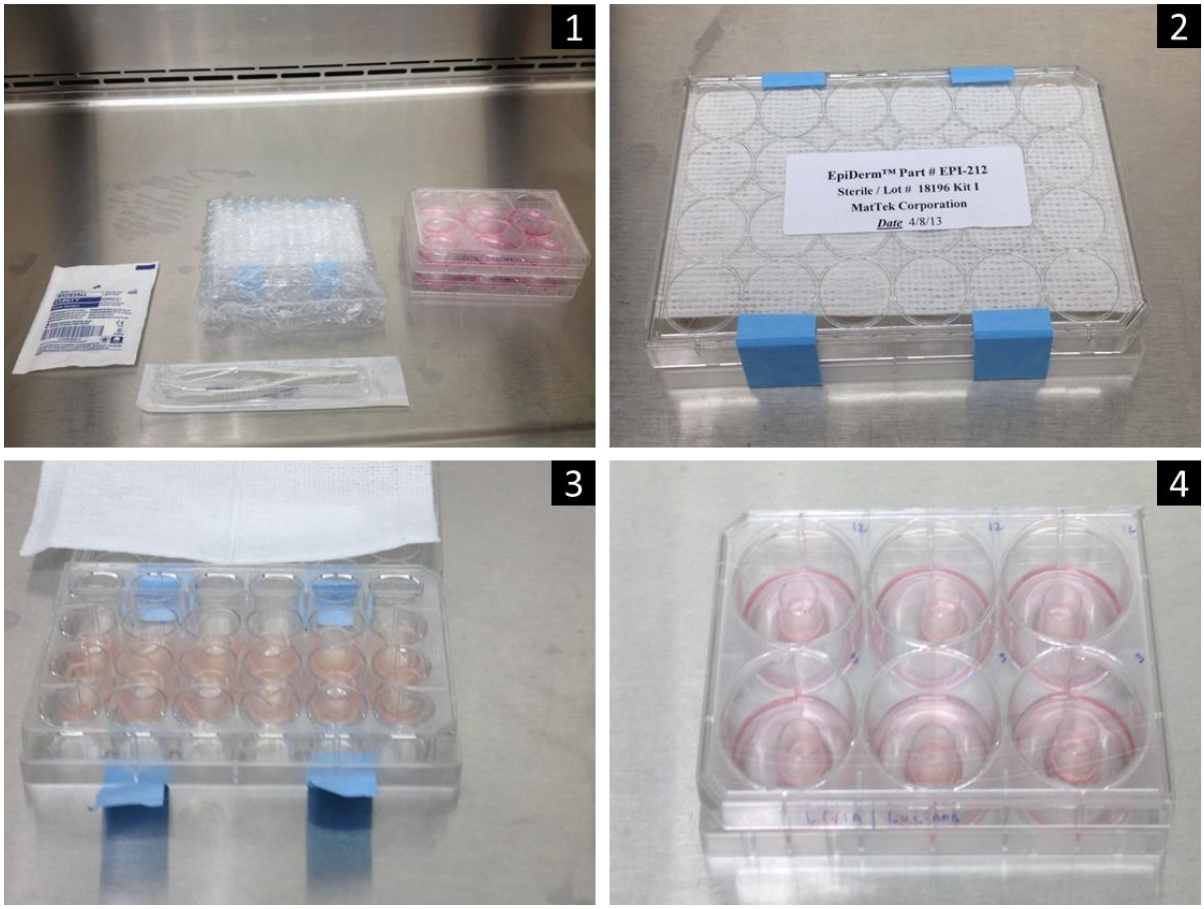


Figura 12 - Condicionamento dos tecidos EpiDerm™. (1) Material necessário para o condicionamento dos tecidos; (2) Remoção da placa contendo os tecidos em ambiente estéril da embalagem; (3) Abertura da placa contendo os tecidos em ambiente estéril para a remoção dos *inserts* da matriz de agarose; (4) Tecidos transferidos para placa de 6 poços contendo 900 µL de meio de cultura pré-aquecido.

3.2.5.2. Tratamentos

Após o condicionamento dos tecidos, o meio de cultura foi renovado e 25 µL da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p), PBS e Triton X-100 (irritante moderado) foram aplicados topicamente nos *inserts* (Figura 13A) por 2, 5 e 12 h em triplicada. Também foi avaliado o potencial de irritação cutânea da NLC simulando um tratamento por 3 dias consecutivos, pois muitas doenças que afetam a pele são crônicas e necessitam de um regime terapêutico prolongado. Para isso, a NLC sem e com siRNA controle, PBS, siRNA controle, PEI:FA, PEI:FA + siRNA controle e Triton X-100 foram aplicados topicamente nos *inserts* por 6 h. siRNA na concentração final de 10 µM. Após esse período, os *inserts* foram lavados com *Dulbecco's* tampão fosfato salino (DPBS) até total remoção das formulações, secos

e incubados por 18 h a 37 ºC com 5% de CO_2. Este tratamento foi repetido por 3 dias consecutivos.

Em ambos os protocolos experimentais, o grupo controle foi formado por tecidos mantidos em cultivo que não receberam nenhum tratamento.

3.2.5.3. Avaliação da irritação cutânea por MTT

Após decorrido os tempos dos tratamentos, o sobrenadante foi coletado para quantificação de IL-1α e os *inserts* foram lavados com DPBS até a total remoção das formulações, secos com auxílio de um *swab* estéril e transferidos para uma placa de 24 poços contendo 300 µL do reagente de MTT (1 mg/mL MTT diluído em DMEM) (Figura 13B). A placa foi incubada por 3 h a 37 ºC com 5% de CO_2.

Finalizado o período de incubação, os *inserts* foram secos com papel absorvente e transferidos para uma placa de 24 poços. Foram adicionados 2 mL de solução extratora em cada poço imergindo completamente os *inserts* (**Figura 13C**). A placa foi vedada com Parafilm® para evitar a evaporação do solvente extrator, protegida da luz com papel alumínio, colocada dentro de um saco plástico e agitada por 2 h.

Encerrado o período de extração, a solução extratora foi homogeneizada em cada poço e 200 µL foram transferidos para uma placa de 96 poços. Foi determinada a densidade óptica das soluções por espectrofotometria em leitor de placa (Synergy 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), a 570 nm (correção de possível interferência com a subtração dos valores obtidos com leitura a 650 nm). A viabilidade foi expressa em porcentagem em relação ao grupo controle (onde os tecidos não receberam nenhum tratamento).

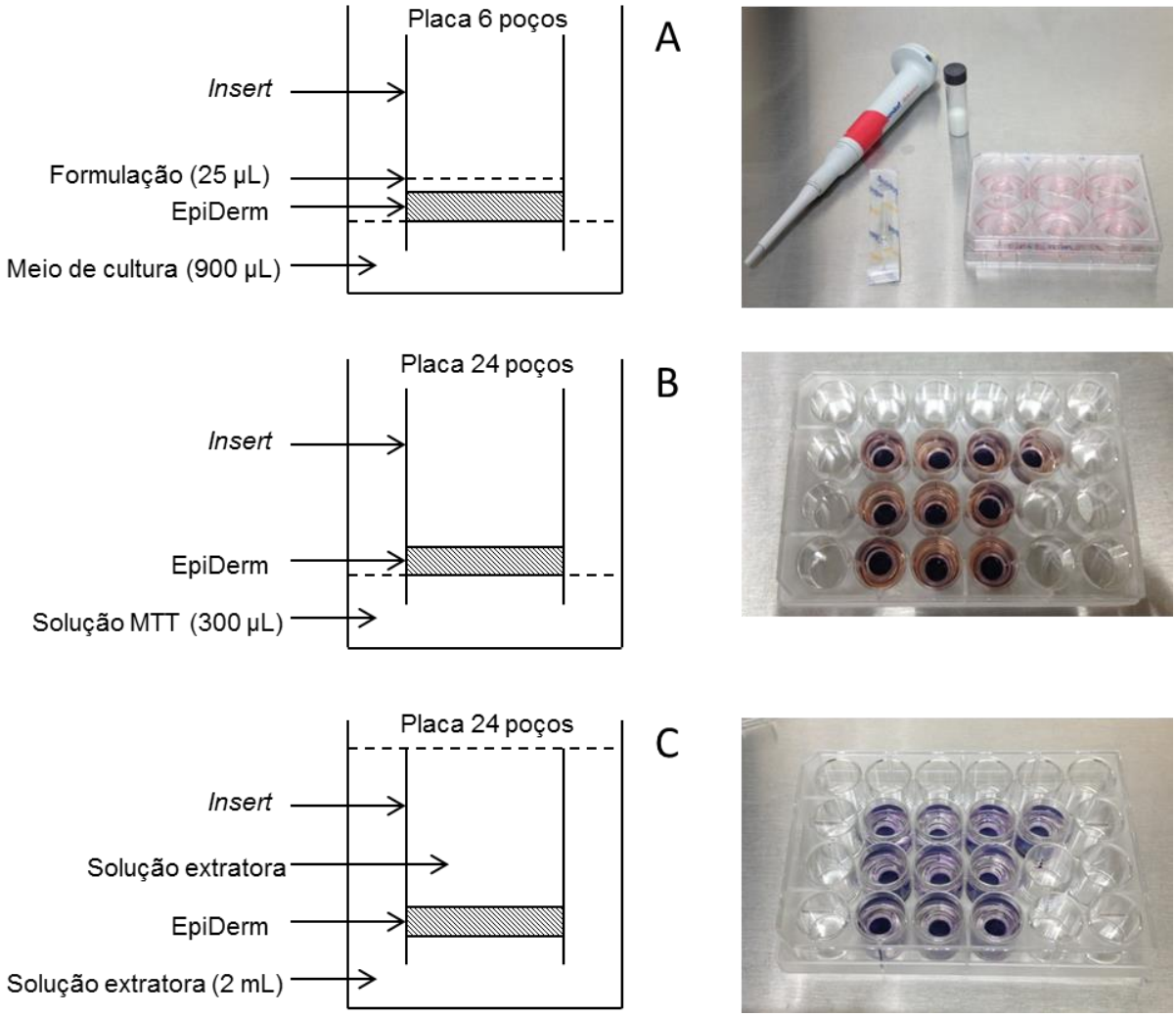


Figura 13 - Etapas do ensaio de irritação cutânea por MTT. (A) Aplicação das formulações nos *inserts*; (B) Tratamento dos tecidos com o reagente de MTT; (C) Extração.

3.2.5.4. Avaliação da irritação cutânea por quantificação de IL-1α

Os níveis extracelulares de IL-1α foram determinados no meio de cultura pelo ensaio imunoenzimático – ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)* (Invitrogen, Camarillo, CA, USA). 50 µL das amostras, controle ou padrão foram pipetados nos poços pré-revestidos com anticorpo específico para IL-1α humana. Em seguida, foram adicionados 50 µL anticorpo conjugado com biotina e 50 µL de tampão de incubação. A placa foi incubada por 2 h em temperatura ambiente.

Finalizado o período de incubação, os poços foram lavados 4 vezes com o tampão de lavagem, foram adicionados 100 µL de solução de estreptavidina-HRP e a placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente. Após esse período, os poços foram novamente lavados 4 vezes com o tampão de lavagem e foram

adicionados 100 µL de solução estabilizadora de cromogênio. Após 30 min de incubação, foram adicionados 100 µL da solução para encerrar a reação (*Stop Solution*) (**Figura 14**). Foi determinada a densidade óptica das soluções por espectrofotometria em leitor de placa (Synergy 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), a 450 nm. A concentração de IL-1α nas amostras foi calculada com base na curva de calibração. As medições foram realizadas em duplicata para cada amostra.

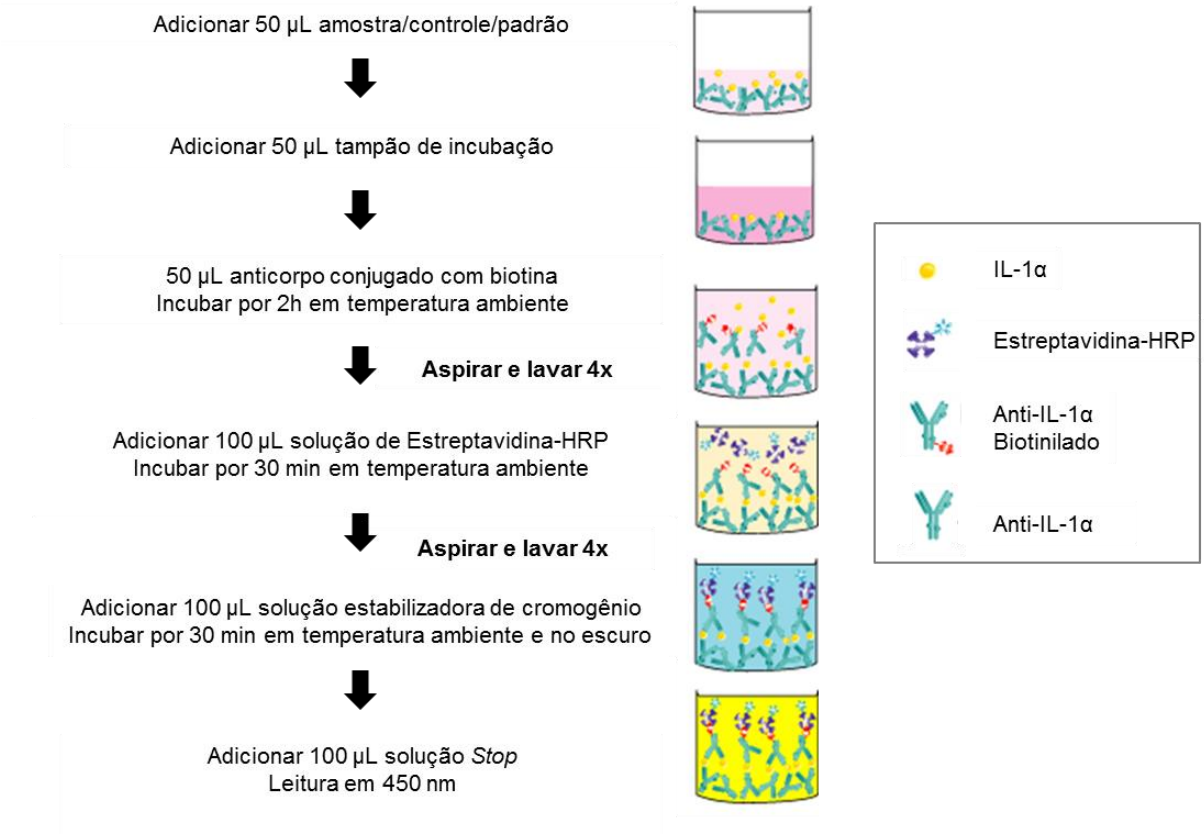


Figura 14 - Esquema do protocolo do ensaio imunoenzimático ELISA para quantificação de IL-1α humana (Invitrogen, Camarillo, CA, USA).

3.2.6. Avaliação da eficácia do silenciamento da IL6 em modelo de pele humana psoriática após o tratamento com a NLC veiculando siRNA IL6

Para o estudo *in vitro* da habilidade da NLC como sistema de liberação de siRNA no tratamento de doenças cutâneas foi utilizado um modelo de pele humana psoriática *full-thickness* (SOR-300-FT, MatTek Corporation, Ashland, MA, USA). Modelos de pele reconstruída do tipo *full-thickness* são modelos *in vitro* mais sofisticados, pois, além da epiderme, possuem um equivalente dérmico que permite a comunicação entre os vários tipos celulares (fibroblastos, queratinócitos,

melanócitos, células de Langerhans), proporcionando um microambiente relevante, bem como a preservação de vias de sinalização importantes para a avaliação da eficácia dos fármacos de aplicação tópica e sistemas de liberação (GROEBER et al., 2011; MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014; DEPIERI et al., 2015).

Esse tecido modelo de psoríase foi desenvolvido usando queratinócitos epidérmicos normais e fibroblastos coletados de lesões psoriáticas. As células foram cultivadas em *inserts* e com meio de cultivo apropriado e livre de soro para a formação de um tecido organizado em multicamadas altamente diferenciadas. Os tecidos apresentam o fenótipo da psoríase evidenciado pelo aumento da proliferação celular basal, expressão de marcadores específicos da psoríase (human β-defensin-2, psoriasin, SKALP/elafin, STAT3 ativado) e elevada liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, GM-CSF, IP-10) (MatTek, 2016).

Como esse modelo de pele psoriática apresenta elevados níveis de liberação da citocina pró-inflamatória IL-6, essa citocina foi o alvo escolhido para a avaliação *in vitro* da atividade silenciadora do siRNA *IL6* veiculado pela NLC, como proposta de sistema de liberação tópico para o tratamento da psoríase.

3.2.6.1. Preparação dos tecidos

Os tecidos foram condicionados conforme metodologia descrita no item 3.2.5.1.

3.2.6.2. Tratamentos

Após o condicionamento dos tecidos, o meio de cultura foi removido, foram adicionados 5 mL de meio de cultivo pré-aquecido a 37 °C e os *inserts* foram colocados sob um suporte de cultura (*stand*) cuidadosamente, para que não houvesse a formação de bolhas de ar entre o tecido e o meio de cultivo (**Figura 15**).

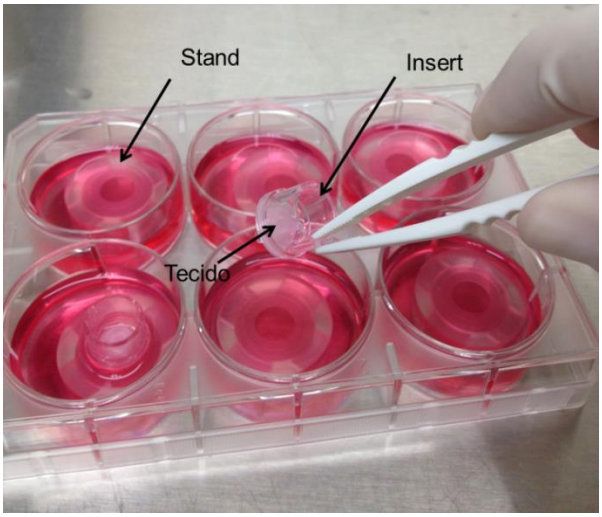


Figura 15 - Disposição dos *inserts* na placa de cultivo para a realização dos tratamentos.

Os tecidos foram tratados por 6, 24 e 72 h (tempo 24 h: 6 h com os tratamentos + 18 h de incubação sem os tratamentos; tempo 72 h: 6 h com os tratamentos + 18 h de incubação sem os tratamentos por 3 dias) com a aplicação tópica de 25 µL da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA específico para o alvo *IL6* (siRNA *IL6*). Como controles foram utilizados PBS, solução de siRNA *IL6* em água livre de RNase, NLC isenta de siRNA *IL6* e um complexo de PEI:FA (1:99, p/p) com siRNA *IL6*. siRNA na concentração final de 10 µM.

Após os períodos de tratamento, o sobrenadante foi recolhido para a quantificação dos níveis extracelulares de IL-6 por ELISA e os tecidos processados para quantificação dos níveis do RNAm *IL6* por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) (após dos tratamentos por 24 e 72 h).

O siRNA utilizado nesses experimentos (siRNA *IL6*) foi sintetizado pela Ambion® (Silencer® Select Validated siRNA, Life Technology, Austin, TX, USA) e possui a seguinte sequência:

- siRNA *IL6* sense: 5'- GGACAUGACAACUCAUCUCtt -3'
- siRNA *IL6* antisense: 5'- GAGAUGAFUUGUCAUGUCCtg -3'

3.2.6.3. Quantificação dos níveis extracelulares de IL-6 por ELISA

Os níveis extracelulares de IL-6 foram determinados pelo ensaio imunoenzimático ELISA. 100 µL das amostras, controle ou padrão foram pipetados nos poços pré-revestidos com anticorpo específico para IL-6 humana. Em seguida,

foram adicionados 50 µL anticorpo conjugado com biotina e a placa foi incubada por 2 h em temperatura ambiente.

Finalizado o período de incubação, os poços foram lavados 4 vezes com tampão de lavagem, foram adicionados 100 µL de solução de estreptavidina-HRP e a placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente. Após esse período, os poços foram novamente lavados 4 vezes com o tampão de lavagem e foram adicionados 100 µL de solução estabilizadora de cromogênio. Após 30 min de incubação, foram adicionados 100 µL da solução para encerrar a reação (*Stop Solution*) (**Figura 16**). Foi determinada a densidade óptica das soluções por espectrofotometria em leitor de placa (Synergy 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), a 450 nm. A concentração de IL-6 nas amostras foi calculada com base na curva de calibração. As medições foram realizadas em duplicata para cada amostra.

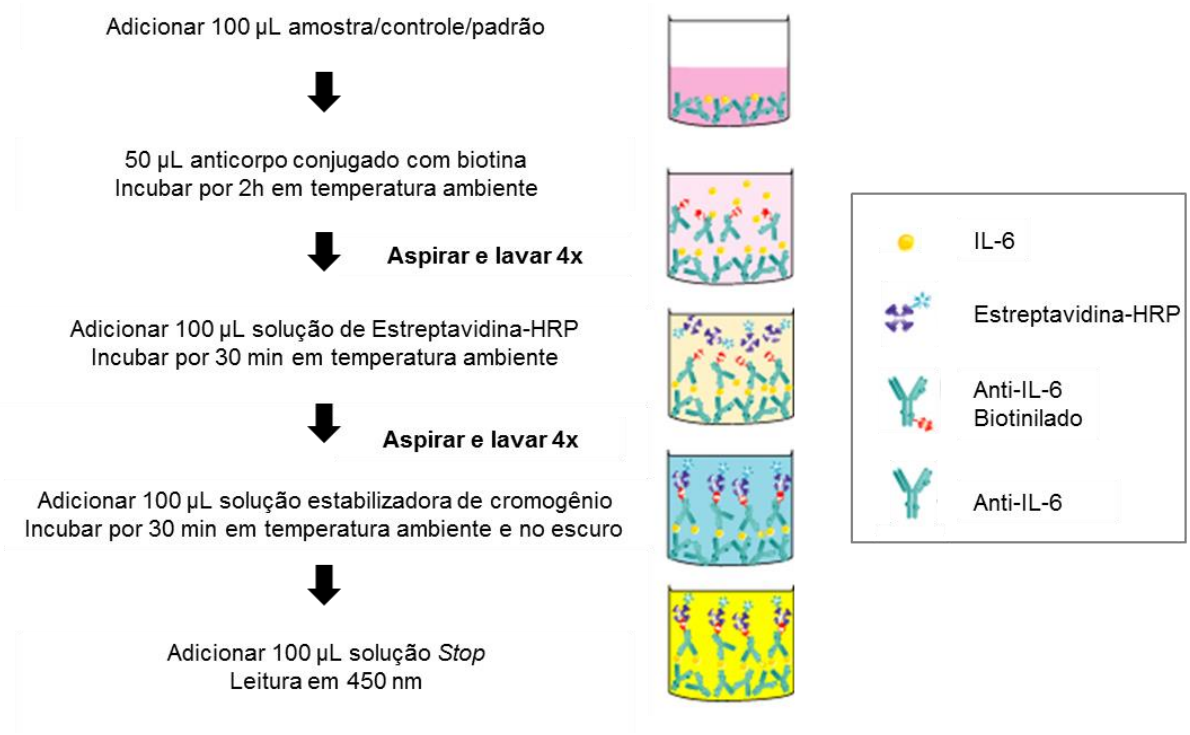


Figura 16 - Esquema do protocolo do ensaio imunoenzimático ELISA para quantificação de IL-6 humana (Invitrogen, Camarillo, CA, USA).

3.2.6.4. Processamento dos tecidos para quantificação dos níveis do RNAm IL6 por qRT-PCR

3.2.6.4.1. Isolamento do RNA

O isolamento do RNA dos tecidos foi realizado utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA).

Resumidamente, os *inserts* foram lavados com DPBS livre dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} até a total remoção das formulações e, após as lavagens, os tecidos foram transferidos para um eppendorf livre de RNase com 600 µL de tampão RLT para lisar o tecido. Com o auxílio de um pilão de plástico, livre de RNase, os tecidos foram homogeneizados. Os homogenatos obtidos foram submetidos à centrifugação por 1 min, a 20.000 x *g*. Os sobrenadantes foram transferidos para eppendorfs livre de RNase e foram adicionados 600 µL de etanol 70%.

As amostras foram transferidas para as colunas de extração que então foram submetidas à centrifugação por 30 s, a 20.000 x *g*. As soluções eluídas através das colunas foram descartadas. Para lavar as colunas, foram adicionados 500 µL do tampão RW1; as colunas foram submetidas à centrifugação por 30 s, 20.000 x *g* e, as soluções eluídas, descartadas. Após a primeira lavagem das colunas, foram adicionados 80 µL de DNase às colunas por 20 min. Após esse período, as colunas foram lavadas novamente com 500 µL do tampão RW1.

As colunas foram submetidas a duas lavagens com 700 µL de tampão RPE, centrifugação por 30 s, a 20.000 x *g* e, as soluções eluídas, descartadas. Finalizado o processo das lavagens, as colunas foram submetidas à centrifugação por 2 min, a 20.000 x *g* para remoção total do tampão e transferidas para eppendorfs livre de RNase para eluição do RNA.

Para eluição do RNA, foram adicionados 35 µL de água livre de RNase diretamente nas membranas das colunas que foram submetidas à centrifugação por 1 min, a 20.000 x *g* (**Figura 17**). A concentração de RNA extraído foi quantificada por espectrometria em 260 e 280 nm utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

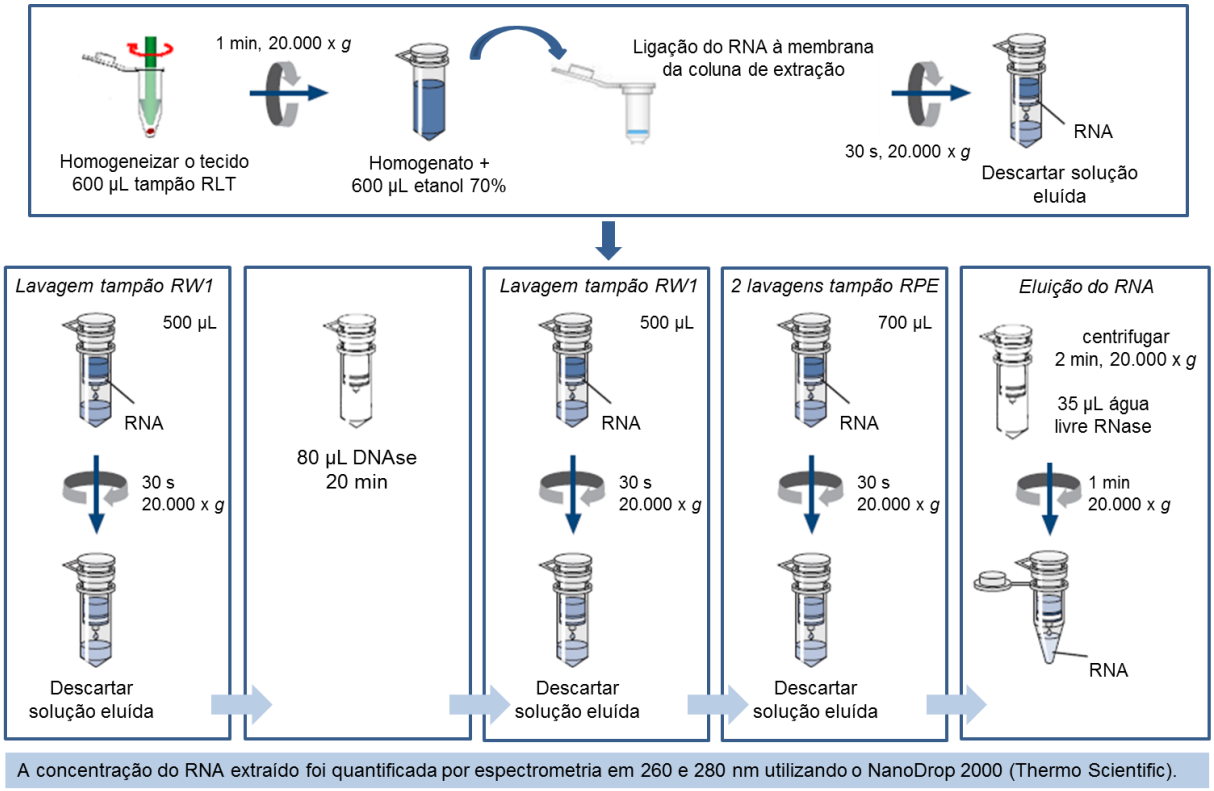


Figura 17 - Etapas para extração do RNA dos tecidos utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA).

3.2.6.4.2. Síntese do DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sistentizado por meio de uma reação de transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Para as reações, foram adicionados 10 µL da solução de RNA (100 µg/mL - 1 µg RNA/reação), 2 µL de tampão, 0,8 de µL de dNTP, 2 µL de *primers* randômicos, 3,2 µL de água ultra pura, 1 µL de inibidor de RNA e 1 µL da enzima transcriptase reversa por poço da microplaca para PCR. A placa foi selada e submetida à centrifugação por 10 s para assegurar que todos os reagentes se encontrassem no fundo dos poços.

A placa foi colocada no termociclador Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e foi utilizada a seguinte condição para a reação da transcriptase reversa: 25 °C por 10 min para ligação do *primer* ao RNA, 37 °C por 2 h para transcrição reversa utilizando a enzima transcriptase reversa e posterior incubação a 85 °C por 5 min para inativação da enzima e finalização do processo e, 4 °C por tempo indeterminado (até a remoção das amostras do equipamento).

3.2.6.4.3. Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

Os cDNAs obtidos por meio de uma reação de transcrição reversa foram amplificados por qRT-PCR utilizando o *primer* para o gene *IL6* e para o gene de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), utilizado como controle endógeno. Os *primers* foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Para as reações de amplificação foi utilizado o kit *LightCycler® 480 Probes Master* (Roche, Salt Lake City, UT, USA). As reações foram realizadas utilizando a mistura dos seguintes reagentes: 0,25 µL do *primer GAPDH*, 0,25 µL do *primer IL6*, 3 µL do *LightCycler® 480 Probes Master* (composta por: Taq DNA polimerase, tampão, dNTP, 6,4 mM $MgCl_2$), 1 µL de cDNA (50 ng), 1 µL de água para PCR por poço da microplaca (384 poços) para PCR. A placa foi selada e submetida à centrifugação por 10 s para assegurar que todos os reagentes se encontrassem no fundo dos poços.

As reações de amplificação realizadas no termociclador LightCycler® 480 (Roche, Salt Lake City, UT, USA) seguiram o seguinte programa: 1 ciclo de 95 °C por 20 s para ativação da enzima polimerase e 40 ciclos de 95 °C por 3 s para desnaturação do DNA; 60 °C por 30 s para o anelamento dos *primers* e polimerização. O LightCycler® 480 Software, Version 1.5, foi utilizado para quantificar as amostras por meio da análise da quantidade de fluorescência gerada pela liberação dos fluoróforo 6-FAM e VIC após a clivagem pela exonuclease 5'.

Os resultados obtidos foram analisados com base no valor do ciclo limiar – Ct (do inglês, *cycle threshold*), sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo no qual a amplificação das amostras atinge um limiar. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o método $\Delta\Delta$Ct, com base na expressão do gene *GAPDH*.

3.2.7. Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pela NLC em macrófagos por citometria de fluxo e por microscopia confocal de varredura a laser

3.2.7.1. Linhagem e cultivo celular

Os ensaios de captação celular foram realizados em cultura celular de macrófagos da linhagem J774 (ATCC® TIB-67™, *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM com 1% (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico composto por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado. Foram incubadas a 37 ºC com 5% de CO_2. As células foram subcultivadas a cada 2-3 dias, usando PBS estéril para lavá-las e um rodo estéril para removê-las da garrafa de cultivo celular. Após a remoção, as células foram submetidas à centrifugação (400 x *g,* por 10 min a 4 °C), ressuspendidas no meio de cultivo e, para contagem de células foi utilizado a câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas a uma densidade de $3x10^5$ células/poço em placas de 24 poços para os ensaios de captação celular. Para o estudo da captação celular por microscopia confocal, lamínulas estéreis foram adicionadas nos poços da placa de cultivo antes do plaqueamento celular.

3.2.7.2. Tratamentos

A NCL foi diluída em PBS (1:100, v/v) e, em seguida, complexada com siRNA-FAM. 50 µL de cada diluição foram utilizados no ensaio de captação celular. Células sem tratamento, solução de siRNA-FAM em água livre de RNase e Lipofectamina 2000 foram utilizados como controles. A concentração final de siRNA por poço foi de 45 nM (22,5 pmol siRNA/$3x10^5$ células/0,5 mL de meio de cultura).

Após 24 h do plaqueamento celular, o meio de cultura foi renovado, as células foram tratadas com as formulações e reincubadas por 24 h a 37 ºC com 5% CO_2. Após os tratamentos, as células foram processadas para a avaliação da captação celular das moléculas de siRNA.

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

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e ressuspendidas em meio de cultura. As células foram analisadas com FACSCalibur e CellQuestPro software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

A taxa captação celular do siRNA foi quantificada pela porcentagem de células positivas para o fluorocrômo FAM medida pelo canal FL1, sendo as células mortas excluídas da análise pela marcação com iodeto de propídio (50 µg/mL). Foram coletados 10.000 eventos por amostra analisada.

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

Após os tratamentos, as células aderidas às lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 2% por 10 min. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com glicina 0,1 M durante 30 min. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e permeabilizadas com solução de triton 0,3% em PBS por 10 min. Novamente, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com solução de bloqueio (albumina sérica bovina – BSA – 1% em PBS) por 15 min. Em seguida, foi removida a solução de bloqueio e foram adicionados 400 µL de solução de faloidina-Texas red por 1 h para marcação do citoesqueleto. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram adicionados 400 µL da solução de DAPI em PBS (0,1 µg/mL) por 15 min para marcação do núcleo. Por último, as células foram lavadas duas vezes com PBS, uma vez com água Milli-Q e vertidas em uma lâmina sobre uma gota do meio de montagem *fluoromount*. As lâminas foram armazenadas sob-refrigeração (2 – 8 °C) durante 24 h para secar o meio de montagem.

As lâminas foram visualizadas em microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP8 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). As imagens foram adquiridas no aumento de 63X, utilizando os lasers UV (405 nm), Visível (488 nm) e Visível (552 nm), adequados para o DAPI, FAM e Texas-red, respectivamente. Para obter dados comparáveis, os parâmetros intensidade dos lasers e sensibilidade (ganho/*offset*) das fotomultiplicadoras foram ajustados e mantidos constantes. O software LAS X foi utilizado para aquisição e processamento das imagens.

3.2.8. Desenvolvimento de modelo in vitro de inflamação para avaliação da eficácia do tratamento com a NLC veiculando siRNA Tnf

3.2.8.1. Avaliação da eficiência de complexação do siRNA Tnf em diferentes doses pela NLC

A capacidade da NLC em complexar diferentes doses de siRNA *Tnf* foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Este estudo foi realizado com a finalidade de garantir que as doses propostas estariam complexadas com a NLC, uma vez que o modo de complexação com o siRNA foi diferente do anteriormente avaliado. Para esses estudos, o siRNA nas doses de 7,5, 30 e 60 pmol foi adicionado à NLC previamente diluída em PBS (1:100) e, após 30 min, a complexação foi verificada.

As amostras foram analisadas em gel de agarose 2% preparado com tampão TAE pH=8,0 e corado com brometo de etídio (10 mg/mL). Para as análises, as amostras foram preparadas com a adição de *loading buffer* na proporção 4:1 (amostra: *loading buffer*). As amostras foram homogeneizadas e aplicadas no gel.

As corridas eletroforéticas foram processadas em cuba horizontal contendo tampão TAE, sob uma voltagem de 100 V, durante 20 min. Os géis, corados com brometo de etídio, foram visualizados sob-luz ultravioleta. Para obtenção das imagens utilizou-se o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) equipado com o software L-PixImage.

3.2.8.2. Linhagem celular e cultivo

Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados como descrito no item 3.2.7.1.

As células foram plaqueadas a uma densidade de $1x10^5$ células/poço em uma placa de 96 poços e incubadas por 24 h a 37º C com 5% de CO_2 para os ensaios de viabilidade celular e silenciamento gênico *in vitro*.

3.2.8.3. Viabilidade celular

A citotoxicidade é considerada um obstáculo para a utilização clínica de carreadores não virais para terapia gênica (LV et al., 2006). Estudos para avaliar a citotoxicidade dos sistemas de liberação de fármacos em linhagens celulares são realizados para determinar a quantidade de nanopartículas capaz de estar em contato com as células durante um determinado tempo, sem causar a morte celular. Esses dados são importantes para determinar as condições experimentais para o

estudo de processos celulares, tais como o silenciamento gênico *in vitro*, onde a viabilidade celular deve ser garantida durante o experimento.

A viabilidade celular dos macrófagos da linhagem J774 foi determinada após os tratamentos com a NLC e a Lipofectamina, sem e com siRNA controle ou *Tnf* e também em associação ao LPS utilizando o ensaio colorimétrico de MTT, previamente descrito por Mosmann (1983) (MOSMANN, 1983).

24 h após o plaqueamento celular, as células foram expostas aos seguintes tratamentos: PBS, NLC, Lipofectamina, NLC + LPS, NCL + siRNA controle + LPS, NCL + siRNA *Tnf* + LPS, Lipofectamina + LPS, Lipofectamina + siRNA controle + LPS, Lipofectamina + siRNA *Tnf* + LPS. A concentração de siRNA por poço foi de 300 nM [800 ng (60 pmol) de siRNA/1x10^5 células/200 µl meio de cultura] que corresponde à maior dose utilizada nos experimentos *in vitro* de silenciamento gênico e a NLC foi previamente diluída em PBS (1:100, v/v). Esses tratamentos também foram realizados no experimento *in vitro* de silenciamento gênico descrito abaixo e foram propostos para verificar a viabilidade celular e assegurar que o silenciamento obtido é resultado da ação do siRNA e não de uma redução na viabilidade celular.

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e incubadas com uma solução de MTT (5 mg/mL) durante 4 h a 37 °C. Os cristais de formazan (resultantes da metabolização do sal tetrazólio pelas células viáveis) foram dissolvidos em 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade óptica das soluções obtidas foi determinada por espectrofotometria em leitor de placa (Synergy 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), a 570 nm. A viabilidade celular foi expressa como percentagem de células viáveis em comparação com o grupo de controle (PBS).

3.2.8.4. Indução in vitro da produção de TNF-α

Após 24 h do plaqueamento celular, o meio de cultura foi renovado por meio sem a adição de soro e antibiótico e, para indução da produção de TNF-α, foi adicionado lipopolissacarídeo de Escherichia coli 0127:B8 (LPS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) na concentração de 500 ng mL^{-1}/poço. A placa foi incubada por 6 e 24 h a 37 ºC com 5% de CO_2. Após esse período, as células foram processadas para quantificação do RNAm *Tnf* por qRT-PCR.

3.2.8.5. Tratamentos

A eficácia do silenciamento do *Tnf* foi determinada por meio da razão da expressão do RNAm *Tnf* normalizado pela média da expressão dos RNAm dos genes de referência *Gapdh* e *Actb* após o tratamento dos macrófagos com a NLC (MO:AO:PEI:FA - 8:2:1:89, p/p/p/p) complexada com siRNA específico para o alvo *Tnf*.

Células foram tratadas com diferentes doses de siRNA (7,5, 30 e 60 pmol) complexado com a NLC uma vez que a razão entre carreador/siRNA é conhecida por afetar a atividade do sistema (AKINC et al., 2008). Também foram avaliados diferentes protocolos de tratamentos: (i) indução da produção de TNF-α com LPS e tratamentos realizados simultaneamente e avaliação feita após 6 e 24 h; (ii) indução da produção de TNF-α com LPS por 2 h e, em seguida, adição dos tratamentos por 24 h e, (iii) pré-tratamento com as formulações por 24 h seguido da indução da produção de TNF-α com LPS por 2 h.

Para todos os protocolos de tratamento, a NLC foi diluída em PBS (1:100, v/v) e 20 µL da solução NLC/siRNA *Tnf* foram adicionados por poço. Como controles foram utilizados Lipofectamina 2000 e PBS. Após os tratamentos, a expressão do RNAm *Tnf* foi analisada por qRT-PCR.

O siRNA utilizado nesses experimentos (siRNA *Tnf*) foi sintetizado pela Ambion® (Silencer® Select Pre-designed siRNA, Life Technology, Austin, TX, USA) e possui a seguinte sequência:

- siRNA *Tnf* sense: 5'- CGUCGUAGCAAACCACCAAtt -3'
- siRNA *Tnf* antisense: 5'- UUGGUGGUUUGCUACGACGtg -3'

3.2.8.6. Avaliação da eficácia do siRNA Tnf veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm Tnf por qRT-PCR

3.2.8.6.1. Isolamento do RNA

O isolamento do RNA das células foi realizado utilizado o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA).

Resumidamente, foram adicionados 300 µL de tampão RLT por poço para lisar as células. Com o auxílio de uma pipeta, as células foram homogeneizadas e, em seguida, foram adicionados 300 µL de etanol 70%.

As amostras foram transferidas para as colunas de extração que então foram submetidas à centrifugação por 1 min, a 10.000 x *g*. As soluções eluídas através das

colunas foram descartadas. Para lavar as colunas, foram realizadas uma lavagem utilizando 700 µL do tampão RW1 (colunas submetidas à centrifugação por 1 min, 10.000 x *g*) e duas lavagens utilizando 500 µL do tampão RPE + etanol (colunas submetidas à centrifugação por 1 min, 10.000 x *g*); as soluções eluídas foram descartadas.

Após finalizadas as lavagens, as colunas foram submetidas à centrifugação por 2 min, a 10.000 x *g* para remoção total do tampão e transferidas para eppendorfs livre de RNase para eluição do RNA. Para eluição do RNA, foram adicionados 40 µL de água livre de RNase diretamente nas membranas das colunas que foram submetidas à centrifugação por 1 min, a 10.000 x *g*. A concentração de RNA extraído foi quantificada por espectrometria em 260 e 280 nm utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (**Figura 18**).

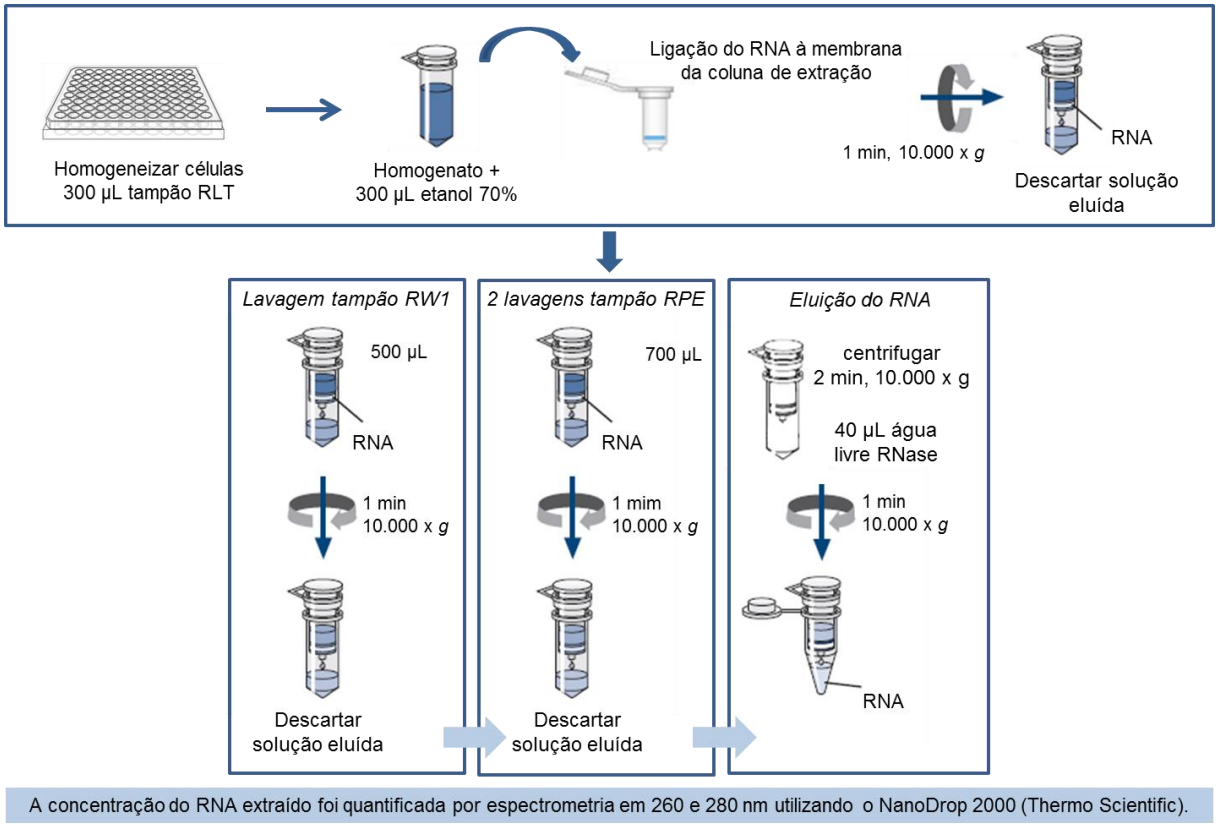


Figura 18 - Etapas para extração do RNA das células utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA).

3.2.8.6.2. Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems,

Austin, TX, USA). Para as reações, foram adicionados 10 µL do master mix (2 µL de tampão, 0,8 de µL dNTP, 2 µL de primers randômicos, 4,2 µL de água ultra pura e 1 µL da enzima transcriptase reversa) e 10 µL da solução de RNA (100 µg/mL - 1 µg RNA/reação) por tubo de 0,1 mL.

Os tubos foram colocados no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e foi utilizada a seguinte condição para a reação da transcriptase reversa: 25 °C por 10 min para ligação do *primer* ao RNA, 37 °C por 2 h para transcrição reversa utilizando a enzima transcriptase reversa e posterior incubação a 85 °C por 5 min para inativação da enzima e finalização do processo e, 4 °C por tempo indeterminado (até a remoção das amostras do equipamento).

3.2.8.6.3. Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

Os cDNAs obtidos foram amplificados por qRT-PCR utilizando os *primers* para o gene *Tnf* e para os genes de referência *Gapdh* e beta actina (*Actb*), utilizados como controles endógenos. Os primers foram obtidos da *Integrated DNA Technologies* (IDT, Coralville, Iowa, USA) e possuem as seguintes sequências:

(i) *Tnf*:

Sonda: 5'-/56-FAM/CCACGTCGT/ZEN/AGCAAACCACCAAGT/3IABkFQ/-3'

Primer 1: 5'-TCTTTGAGATCCATGCCGTTG-3'

Primer 2: 5'-AGACCCTCACACTCAGATCA-3'

(ii) *Gapdh*:

Sonda: 5'-/56-FAM/TGCAAATGG/ZEN/CAGCCCTGGTG/3IABkFQ/-3'

Primer 1: 5'-GTGGAGTCATACTGGAACATGTAG-3'

Primer 2: 5'-AATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'

(iii) *Actb*:

Sonda: 5'-/HEX/AGACCTTCA/ZEN/ACACCCCAGCCATG/3IABkFQ/-3'

Primer 1: 5'-GTACGACCAGAGGCATACAG-3'

Primer 2: 5'-CTGAACCCTAAGGCCAACC-3'

Para as reações de amplificação foi utilizado o kit *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas utilizando a mistura dos seguintes reagentes: 10 µL do TaqMan master mix (composto por: Taq DNA polimerase, tampão, dNTP, 6,4 mM $MgCl_2$), 1 µL do *primer Gapdh* ou 1 µL do *primer*

Tnf, 1 µL do *primer Actb*, 50 ng de cDNA, água livre de RNase na quantidade suficiente para completar 20 µL do volume final dos reagentes. A placa foi selada e submetida à centrifugação por 2 min, 1.000 x *g* para assegurar que todos os reagentes se encontrassem no fundo dos poços.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e seguiram o seguinte programa: 1 ciclo de 95 °C por 20 s para ativação da enzima polimerase e 40 ciclos de 95 °C por 1 s para desnaturação do DNA; 60 °C por 20 s para o anelamento dos *primers* e polimerização. O StepOne™ Software, v.2.2.2, foi utilizado para quantificar as amostras por meio da análise da quantidade de fluorescência gerada pela liberação dos fluoróforos 6-FAM e HEX após a clivagem pela exonuclease 5'.

Os resultados obtidos foram analisados com base no valor do Ct, sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo no qual a amplificação das amostras atinge um limiar. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o método ΔΔCt, com base na expressão dos genes *Gapdh* e *Actb*.

3.2.9. Avaliação da eficácia do silenciamento do Tnf em modelo in vivo de inflamação aguda após o tratamento com a NLC veiculando siRNA Tnf

3.2.9.1. Animais

Os estudos *in vivo* foram conduzidos utilizando camundongos sem pêlos, machos, adultos da linhagem HRS/J laboratório Jackson (BarlHarbor, ME, EUA). Os animais foram criados no Biotério da FCFRP-USP, mantidos a 20-25 °C, com livre acesso de água e alimento, 4 trocas de ar/h e ciclos claro/escuro de 12 h. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto-USP (protocolo n°12.1.938.53.3).

3.2.9.2. Indução da inflamação cutânea aguda e esquema terapêutico

Para determinar o efeito do siRNA incorporado na NLC (MO:AO:PEI:FA - 8:2:1:89, p/p/p/p) sobre a expressão de TNF-α, a indução desta citocina pró-inflamatória na pele de camundongos foi realizada seguindo o modelo de inflamação cutânea induzida por 12-O-tetradecanoil-forbol 13-acetato (TPA) (100 µg/mL em

acetona – 162 µM) descrito por Murakawa e colaboradores (2006) (MURAKAWA et al., 2006).

Os animais (n = 4-5 animais/grupo) foram divididos nos seguintes grupos: (1) Grupo controle – não tratado; (2) Grupo tratado com TPA; (3) Grupo tratado com a NLC e TPA; (4) Grupo tratado com a NLC complexada com siRNA controle e TPA; (5) Grupo tratado com a NLC complexada com siRNA *Tnf* e TPA. siRNA na concentração final de 10 µM.

O protocolo de tratamento (**Figura 19**) consistiu na aplicação de 100 µL das respectivas formulações em uma área de aproximadamente 2 cm^2 no dorso dos animais pertencentes aos grupos (3), (4) e (5). Após 1 h esses animais receberam novamente 100 µL dessas formulações e 100 µL de solução de TPA. Os animais do grupo (2) foram tratados somente com 100 µL de solução de TPA. Após 6 h do tratamento com TPA, os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono e a área da pele tratada foi removida e armazenada a -80 °C em solução estabilizadora de RNA (RNA*later*® *Stabilization Solution* – Ambion, Carlsbad, CA, USA).

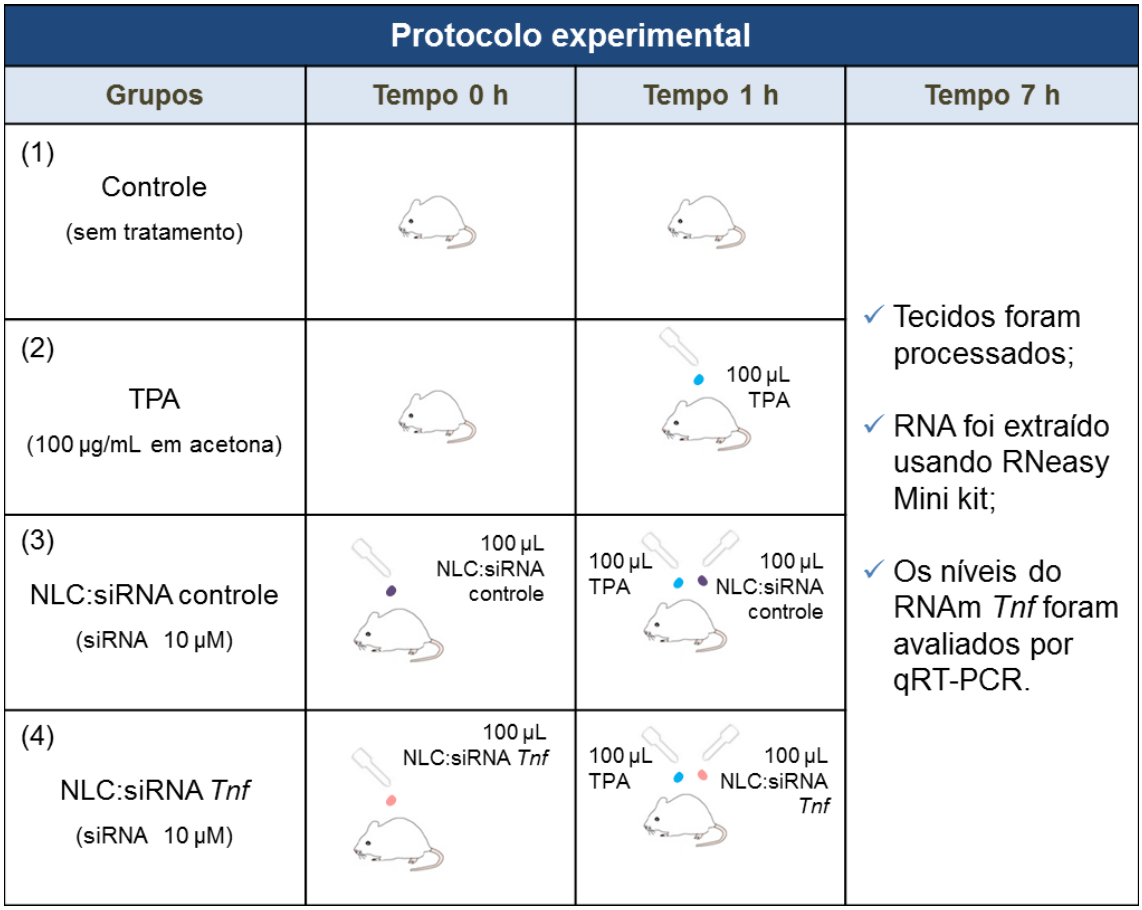


Figura 19 - Esquema do protocolo experimental para a determinação da eficácia *in vivo* da NLC (MO:AO:PEI:FA, 8:2:1:89, p/p/p/p) veiculando siRNA em modelo de inflamação aguda induzida com TPA.

3.2.9.3. Avaliação da eficácia do siRNA Tnf veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm Tnf por qRT-PCR

Para determinação nos níveis do RNAm *Tnf*, as amostras de pele foram transferidas para eppendorfs contento 500 µL do tampão de lise RLT, homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador de tecido (Tissue Tearor™, Biospec Products, Bartlesville, OK, USA), 20.000 rpm por 1 min e submetidas à centrifugação a 400 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e, em seguida, foram adicionados 500 µL de etanol 70%. As soluções obtidas foram utilizadas para extração do RNA utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), conforme descrito no item 3.2.8.6.1.

Os cDNAs foram sintetizados a partir dos RNAs extraídos dos tecidos por meio de uma reação de transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* que foram amplificados e quantificados por qRT-PCR conforme descrito nos itens 3.2.8.6.2. e 3.2.8.6.3.

3.2.10. Avaliação da eficácia do silenciamento do Tnf em modelo in vivo de psoríase após o tratamento com a NLC veiculando siRNA Tnf

3.2.10.1. Animais

Os estudos *in vivo* foram conduzidos utilizando camundongos machos isogênicos Balb/c (7–10 semanas de vida) obtidos do Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob aprovação do Comitê de Ética Animal dessa instituição (adendo 100/13/CEUA).

3.2.10.2. Indução da psoríase e esquema terapêutico

Para determinar o efeito do siRNA incorporado na NLC (MO:AO:PEI:FA, 8:2:1:89, p/p/p/p) sobre a expressão de TNF-α, citocina pró-inflamatória com expressão elevada na psoríase, foi utilizado o modelo de psoríase *in vivo* induzida por imiquimode (IMQ) descrito por van der Fits e colaboradores (2009) (VAN DER FITS et al., 2009).

Para a indução da psoríase experimental (**Figura 20**), primeiramente, o dorso dos camundongos (6 cm^2) foi depilado com creme depilatório (Veet, Brasil) sob anestesia inalatória (oxigênio + isoflurano 97:3). Após 72 h, os animais receberam uma dose tópica diária (65 mg) de imiquimode creme 5% (Modik, Germed, Brasil), que foi cuidadosamente espalhada entre o dorso e orelhas dos camundongos por cinco dias consecutivos, resultando numa dose diária de 3,25 mg do composto ativo (IMQ). O grupo controle recebeu de forma similar o respectivo veículo, vaselina em creme. No segundo dia de protocolo, os camundongos foram subdivididos em 5 grupos (n = 5 animais/grupo): (1) grupo tratado com vaselina + NLC; (2) grupo tratado com IMQ + NLC; (3) grupo tratado com IMQ + NLC complexada com siRNA controle; (4) grupo tratado com IMQ + NLC complexada com siRNA *Tnf* e, (5) grupo tratado com IMQ + NLC + siRNA controle-Alexa 647. siRNA na concentração final de 10 μM.

O protocolo de tratamento consistiu na aplicação de 65 mg de IMQ ou vaselina (1x/dia) e de 65 mg das respectivas formulações (2x/dia), com 6 h de intervalo entre os tratamentos, buscando evitar interações entre o IMQ e a NLC e/ou o siRNA.

Ao longo do período de indução e tratamento da psoríase, mensuração da espessura das orelhas e registros fotográficos para acompanhamento da evolução do quadro psoriático induzido pelo IMQ foram realizados diariamente (1x/dia, antes

da aplicação do IMQ). No último dia, filmagem do comportamento dos animais (em particular, da região dorsal) foi realizada durante 30 min.

No 6º dia, os animais foram submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica (isoflurano 5%). A pele dorsal foi removida e dividida em três partes para: (i) determinação nos níveis do RNAm *Tnf* por qRT-PCR, (ii) determinação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e, (iii) análise histológica (visualização da migração de células inflamatórias e cálculo da espessura da epiderme). A pele dorsal dos animais do grupo 5 foram utilizadas para visualização na penetração cutânea do siRNA por microscopia confocal de varredura a laser.

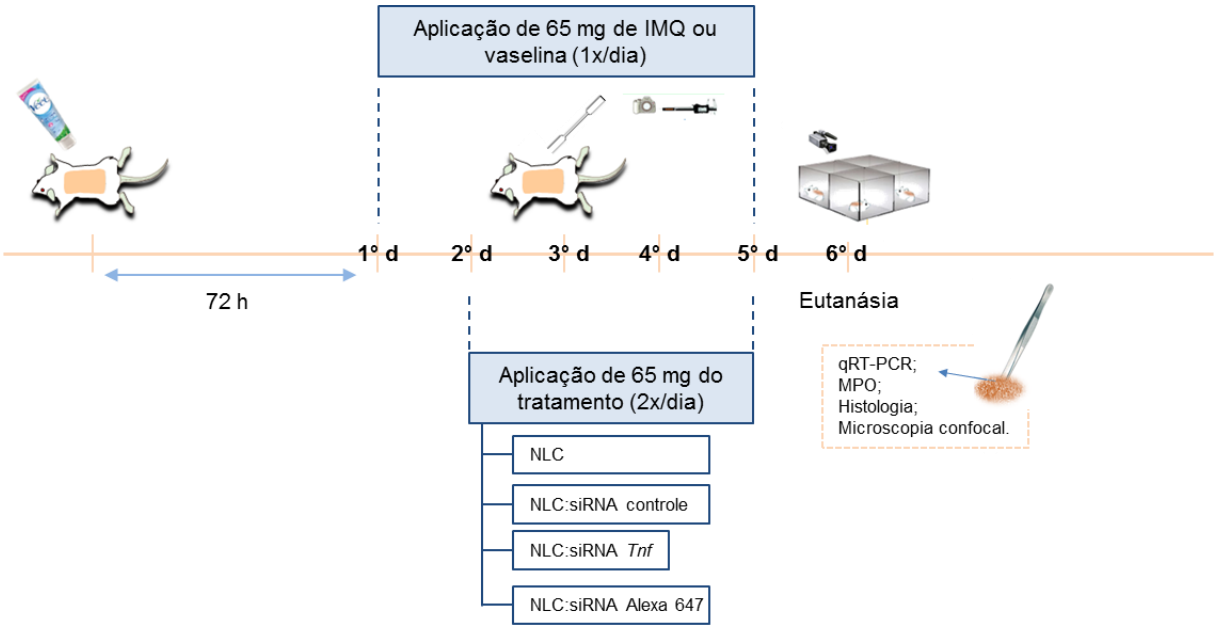


Figura 20 - Protocolo experimental de indução de psoríase com IMQ associado ao tratamento com a NLC isenta e veiculando siRNA controle ou siRNA *Tnf*.

3.2.10.3. Avaliação da eficácia do siRNA Tnf veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm Tnf por qRT-PCR

Para determinação nos níveis do RNAm *Tnf*, as amostras de pele foram transferidas para eppendorfs contento 500 µL do tampão de lise RLT, homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador de tecido, 20.000 rpm por 1 min e submetidas à centrifugação a 400 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e, em seguida, foram adicionados 500 µL de etanol 70%. As soluções obtidas foram utilizadas para extração do RNA utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), conforme descrito no item 3.2.8.6.1.

Os cDNAs foram sintetizados a partir dos RNAs extraídos dos tecidos por meio de uma reação de transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* que foram amplificados e quantificados por qRT-PCR conforme descrito nos itens 3.2.8.6.2. e 3.2.8.6.3.

3.2.10.4. Avaliação da eficácia anti-inflamatória do siRNA Tnf veiculado pela NLC pela medida da atividade da mieloperoxidade (MPO)

Fragmentos da pele dorsal de cada animal (100 mg) foram homogeneizados em solução tampão (NaCl 0,1 M; Na_2EDTA 0,015 M; Na_3PO_4 0,02 M, pH 4,7) (300 µL/ 0,1 g de pele) com o auxílio de um homogeneizador de tecido, 20.000 rpm por 1 min. As amostras foram submetidas à centrifugação a 1.000 x *g* por 15 min e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 1 mL de NaCl 2%, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 s, novamente submetidas à centrifugação a 1.000 x *g* por 15 min e os sobrenadantes foram descartados.

Foram adicionados 500 µL de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 5,4 contento 0,5% do detergente iônico brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). As amostras foram homogeneizadas com o auxílio do homogeneizador de tecido, 20.000 rpm por 1 min. As amostras foram submetidas à centrifugação (11.200 x *g*, 15 min, 4 °C) e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para dosagem da atividade da MPO.

O sobrenadante de cada amostra (10 µl) foi incubado com 40 µL de tampão fosfato de sódio 0,08 M (pH 5,4), 25 µL da solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em DMSO na concentração final de 1,6 mM e com 100 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração final de 0,5 mM por 5 min a 37 °C. A reação foi paralisada pela adição de 75 µL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4 M. A densidade óptica (D.O.) das soluções obtidas foi determinada por espectrofotometria em leitor de placa (Synergy 2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), a 450 nm. Os resultados foram expressos em D.O. por 100 mg de tecido.

3.2.10.5. Análises histológicas

Fragmentos da pele dorsal foram removidos e fixados em formaldeído (4%) durante 8 h, à temperatura de 8 ºC. A seguir, as amostras foram submetidas às sessões de desidratação em etanol 70%, 95% e 100%, seguidas de xilol (I, II e III; 40 min) e, então, incluídas em Paraplast®. Espécimes de 5 µm foram obtidos com o

auxílio de micrótomo rotativo manual (820 Spencer Microtome, AO® American Optical, Buffalo, NY, USA) e, depois, montados em lâminas contendo Poly-L-Lysine. A seguir, as lâminas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e montadas para visualização sob microscopia óptica.

As secções de pele foram examinadas sob microscopia de luz convencional (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para análise da espessura da epiderme e a infiltração de células inflamatórias na derme. Espessura da epiderme foi medida usando o software de processamento de imagens, Image J (NIH, Maryland, MD, USA). Peles de animais tratados com Vaselina + NLC foram utilizadas como controle.

3.2.10.6. Avaliação do efeito do siRNA Tnf veiculado pela NLC no índice da área e severidade da psoríase (PASI)

O grau de inflamação cutânea no dorso dos animais foi quantificado via sistema de escore, o qual baseia-se no Índice da Área e Severidade da Psoríase (PASI - http://pasi.corti.li/). Rubor e descamação foram avaliados independentemente, adotando-se uma escala crescente de 0 – 4, sendo 0 = nada; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso; 4 = muito intenso. A análise inicial da acantose foi representada pelo aumento da espessura da orelha, medida diariamente (em triplicata) com o auxílio de um paquímetro digital (Satarrett® 799, Athol, MA, USA) e os resultados foram expressos em milímetros (mm).

3.2.10.7. Avaliação do efeito do siRNA Tnf veiculado sobre o comportamento de prurido espontâneo

O registro comportamental do prurido espontâneo de cada animal foi realizado no 6° dia do protocolo experimental por meio da filmagem (filmadora Sony Handycam DCR-PJ6) dos animais durante 30 min. Para as filmagens, os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico (12 x 20 x 17 cm, Insight; Ribeirão Preto; SP) em sala adequada e adaptada para filmagem.

Foi considerado como comportamento de ataque de coceira, três ou mais movimentos rápidos da pata traseira do animal sobre a região dorsal (COSTA et al., 2006), onde foi aplicado o creme IMQ. Os resultados foram expressos em números de ataques de coceira por 30 min.

3.2.11. Avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLC por microscopia confocal de varreadura a laser

A penetração do siRNA na pele dos camundongos com psoríase foi investigada por microscopia confocal de varredura a laser. Para isso, foi utilizado um siRNA controle marcado com Alexa 647, adequado para excitação com o laser 638 nm e possui emissão máxima em comprimentos de onda acima de 665 nm.

No 6° dia do experimento, após a morte dos animais, as peles foram removidas, lavadas cuidadosamente, congeladas em matriz O.C.T. (Tissue Tek®) e seccionadas transversalmente em criostato. Foram obtidos cortes histológicos de 10 µm de espessura, montados em lâminas tratadas com silano para auxiliar a aderência do corte à lâmina.

Os cortes foram lavados com PBS para remoção do excesso de Tissue Tek e incubados com solução de DAPI (0,3 µg/ mL) por 15 min. Após esse período, os cortes foram novamente lavados com PBS, foi adicionado 1 ou 2 gotas do meio de montagem *fluoromount* sobre os cortes e a lamínula foi vertida cuidadosamente sobre os cortes para não ocorrer a formação de bolhas. As lâminas foram armazenadas sob-refrigeração (2-8 °C) durante 24 h para secar o meio de montagem.

As lâminas foram visualizadas em microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP8 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). As imagens foram adquiridas no aumento de 63X, utilizando os lasers UV (405 nm) e Visível (638 nm), adequados para o DAPI e o Alexa-647, respectivamente. Para obter dados comparáveis, os parâmetros intensidade dos lasers e sensibilidade (ganho/*offset*) das fotomultiplicadoras foram ajustados e mantidos constantes. O software LAS X foi utilizado para aquisição e processamento das imagens.

3.2.12. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística *Prism GraphPad*®. Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão. A diferença entre os grupos foi determinada pela análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p<0,05$.

Resultados e discussões

4. Resultados e discussões

O estudo da aplicação de siRNAs no tratamento de doenças cutâneas tem obtido avanços importantes na elucidação de potenciais alvos moleculares e no desenvolvimento farmacotécnico de sistemas de liberação para uma entrega funcional dessas moléculas nas células alvo (VICENTINI et al., 2013a).

Embora o siRNA seja um forte candidato a agente terapêutico, sua liberação é um fator limitante. O desenvolvimento de sistemas de liberação tem sido investigado com o objetivo de superar as limitações inerentes às vias de administração e às decorrentes das características das moléculas de siRNA: i) hidrofilicidade, tamanho (~13 kDa) e carga negativa que as impede de atravessar as membranas celulares passivamente; (ii) rápida degradação do siRNA por enzimas endógenas que resultam em uma biodisponibilidade insuficiente (REISCHL; ZIMMER, 2009; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009).

Sistemas líquido-cristalinos compostos por MO e AO, bem como suas dispersões coloidais aquosas, são de grande interesse de estudo devido seu potencial como sistemas de liberação de fármacos. O nosso grupo de pesquisa têm estudado estes sistemas para liberação de compostos de interesse farmacêutico para a pele, por apresentarem características interessantes para aplicação tópica, tais como a estrutura de camada lipídica, possibilidade de incorporar promotores de absorção cutânea nas formulações e a capacidade de reduzir, de forma reversível, a barreira exercida pelo EC, facilitando assim, a difusão de fármacos (LOPES et al., 2006a, 2006b; LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007; PRAÇA et al., 2012; PETRILLI et al., 2013; VICENTINI et al., 2013b; ROSSETTI et al., 2016).

Neste contexto, nanodispersões líquido-cristalinas foram desenvolvidas e caracterizadas como proposta de sistema de liberação tópico para siRNA. Nestes sistemas, previamente desenvolvidos, foi avaliada a incorporação dos adjuvantes catiônicos PEI e OAM (0 – 5%) nos sistemas compostos por MO:FA e MO:AO:FA para complexação com as moléculas de siRNA. Dentre as concentrações avaliadas, a incorporação de 0,4% de ambos os adjuvantes no sistema MO:FA e a incorporação de 1,0% de PEI e 2,5% de OAM no sistema MO:AO:FA foram as escolhidas para a continuação dos estudos. A incorporação dessas concentrações aos sistemas MO:FA e MO:AO:FA mantiveram a estrutura líquido-cristalina, fato comprovado por meio da microscopia de luz polarizada e da difração de raios X. Estes sistemas foram capazes de complexar o siRNA na concentração final de 10

μM, não apresentaram citotoxidade e proporcionaram a penetração do siRNA nas camadas mais profundas da pele (DEPIERI, 2012).

4.1. Obtenção e caracterização das NLCs

A literatura descreve vários métodos de dispersão utilizados para a formação de nanopartículas de cristais líquidos, tais como: i) aplicação de alta energia, por exemplo: sonicação, microfluidização e homogeneização por alta pressão; ii) método de pré-mistura com a formação de um filme seco de lipídios e estabilizante e posterior agitação mecânica durante a hidratação do filme e; iii) processo de diluição de lipídios na presença de etanol (emulsificação espontânea) (YAGHMUR; GLATTER, 2009; PAN et al., 2013; MILAK; ZIMMER, 2015).

Os métodos utilizados para dispersão podem afetar de forma relevante as propriedades das dispersões como, por exemplo, parcial ou total perda da estrutura líquido-cristalina, instabilidade e presença de grandes partículas. Como os sistemas líquido-cristalinos são bastante sensíveis aos processos de preparo (composição, modo de preparo e dispersão), essas etapas devem ser escolhidas cuidadosamente de forma que o produto final mantenha a característica líquido-cristalina bem como apresente um adequado tamanho e distribuição de tamanho das partículas (WÖRLE et al., 2007).

Dentre os métodos citados, foi escolhido o método de dispersão de alta energia, utilizando a sonicação para obtenção das NLCs. A sonicação (16-18 Watts) das formulações foi realizada em banho de gelo durante 4 min, sendo que as NLCs obtidas apresentaram um aspecto leitoso e homogêneo após o processo de dispersão.

Os resultados da caracterização por espalhamento dinâmico de luz obtidos das NLCs preparadas com os adjuvantes catiônicos PEI e OAM, sem e com siRNA, encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Tamanho de partícula, PdI e potencial zeta das NLCs preparadas com PEI ou OAM, sem e com siRNA 10 µM.

FORMULAÇÃO	Sem siRNA			Com siRNA 10 µM		
	Tamanho de partícula (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)	Tamanho de partícula (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
MO:PEI:FA (10:0,4:89,6 – p/p/p)	150 ± 6	0,14 ± 0,02	4,2 ± 0,4	161 ± 21	0,19 ± 0,08	1,5 ± 1,9
MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89 – p/p/p/p)	203 ± 5	0,26 ± 0,02	1,2 ± 0,7	215 ± 8	0,27 ± 0,02	0,7 ± 1,0
MO:OAM:FA (10:0,4:89,6 – p/p/p)	196 ± 32	0,31 ± 0,07	29,3 ± 3,7	145 ± 11	0,19 ± 0,01	24,8 ± 6,0
MO:AO:OAM:FA (8:2:2,5:87,5 – p/p/p/p)	231 ± 58	0,37 ± 0,09	2,1 ± 3,2	240 ± 54	0,42 ± 0,04	11,7 ± 2,0

A dispersão da fase gel das formulações produziu partículas com o tamanho médio em torno de 200 nm e com índice de polidispersão abaixo de 0,3 para as formulações preparadas com PEI e abaixo de 0,4 para as preparadas com OAM. As partículas apresentaram um residual de carga positivo que é interessante para a interação com as membranas celulares (GEUSENS et al., 2009; GÜNTHER et al., 2011). O siRNA incorporado às formulações não alterou de forma significativa os parâmetros avaliados.

Os resultados obtidos estão de acordo com os relatados na literatura em que a dispersão de um sistema baseado em MO, AO, Poloxamer e com incorporação de outros fármacos produziram partículas nesta escala nanométrica (LOPES et al., 2006a, 2006b; LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007; ROSSETTI et al., 2011, 2016; PRAÇA et al., 2012; PETRILLI et al., 2013; VICENTINI et al., 2013b). Também demonstraram a reprodutibilidade do método utilizado para obter a nanodispersão líquido-cristalina.

4.2. Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pelas NLCs em fibroblastos por citometria de fluxo

Um eficiente silenciamento gênico por meio do uso de siRNAs é dependente da captação celular, tráfego intracelular, escape endossomal e liberação efetiva do siRNA de seu carreador (DOUGLAS; PICCIRILLO; TABRIZIAN, 2008; BENFER; KISSEL, 2012; ZHANG; MCINTOSH; GRINSTAFF, 2012; ALABI et al., 2013). Estudos têm mostrado que a liberação de siRNA livre resulta em baixas taxas de silenciamento gênico *in vitro* e *in vivo* como resultado de uma captação celular

ineficiente e ressaltam a importância de veiculação do siRNA em sistemas de liberação capazes de complexar e proteger o siRNA do ataque enzimático, bem como promover sua captação celular (REISCHL; ZIMMER, 2009; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; KREBS; ALSBERG, 2011). Dessa forma, a capacidade das NLCs em promover a captação celular do siRNA foi avaliada por citometria de fluxo.

A captação celular das moléculas de siRNA após o tratamento das células por 24 h com os complexos PEI:FA:siRNA-FAM (0,4:99,6 e 1:99 – p/p) foi de 95,9 ± 1,0 e 94,6 ± 0,5%, respectivamente e, após o tratamento com as NLCs MO:PEI:FA e MO:AO:PEI:FA com siRNA-FAM foi 79,6 ± 13,1 e 89,5 ± 1,9%, respectivamente. Os resultados obtidos após o tratamento com os complexos OAM:FA:siRNA-FAM (0,4:99,6 e 2,5:97,5 – p/p) foi 0,15 ± 0,05 e 0,12 ± 0,01%, respectivamente e, após o tratamento com as NLCs MO:OAM:FA e MO:AO:OAM:FA com siRNA-FAM foi 0,19 ± 0,04 e 2,5 ± 3,6%, respectivamente. O tratamento com a solução de siRNA-FAM resultou em uma captação de 0,09 ± 0,01%, como mostram as **Figuras 21** e **22**.

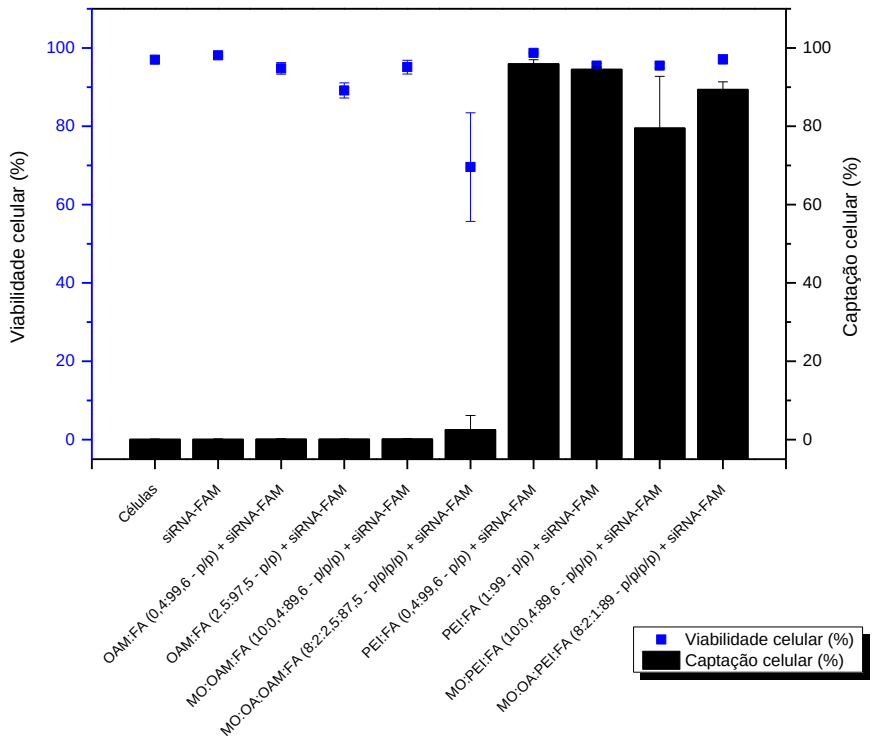


Figura 21 - Captação e a viabilidade celular do siRNA-FAM, complexos formados entre os adjuvantes catiônicos PEI e OAM com siRNA-FAM e as NLCs complexadas com siRNA-FAM determinado por citometria de fluxo. siRNA-FAM na concentração final de 20 nM/poço (20 pmol siRNA/6x10^5 células/mL de meio de cultura). Resultados representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão.

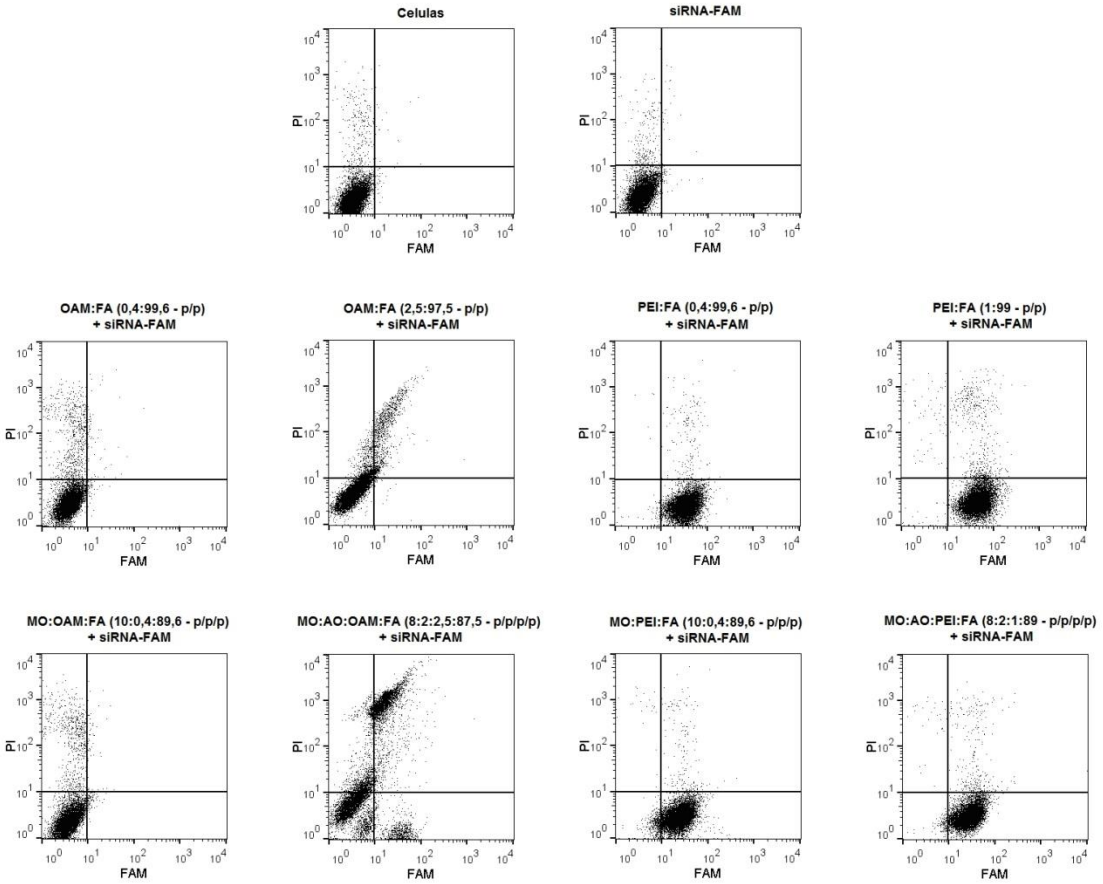


Figura 22 - Dot plot representativo do siRNA-FAM, complexos formados entre os adjuvantes catiônicos PEI e OAM com siRNA-FAM e as NLCs complexadas com siRNA-FAM determinado por citometria de fluxo. siRNA-FAM na concentração final de 20 nM/poço (20 pmol siRNA/6x10^5 células/mL de meio de cultura).

Dentre os adjuvantes catiônicos utilizados para o carreamento de ácidos nucléicos, o PEI é bastante utilizado devido sua capacidade de promover altas taxas de transfecção celular decorrente de sua estrutura molecular com grupamentos amina protonáveis em cada terceira posição. Em pH fisiológico, cerca de 20% destes grupos estão protonados permitindo ligações não covalentes com siRNAs e formação de complexos estáveis com elevada capacidade de transfecção celular. Uma vez internalizado, a liberação intracelular do siRNA dos endossomos ocorre por meio do mecanismo conhecido como "efeito de esponja de prótons". No pH endossomal, em torno de 5, o número de grupos protonados aumenta (de 20 para 45%) o que induz um forte influxo de íons e de água para o interior do endossomo, resultando na ruptura da membrana endossomal e libertação dos conteúdos internalizadas (AKINC et al., 2005; GÜNTHER et al., 2011).

Por outro lado, observou-se uma baixa taxa de transfecção celular utilizando a OAM, um lipídio monocatiônico contendo uma cadeia monoleil. Uma hipótese que pode explicar a baixa ou ausência de transfecção obtida com as NLCs preparadas com OAM e os complexos OAM:FA com siRNA-FAM é sua interação com as glicosaminoglicanas (GAGs) aniônicas (ácido hialurônico e sulfato de heparan) presentes e secretadas pela membrana citoplasmática. As GAGs são polissacarídeos lineares carregados negativamente e os principais componentes da membrana extracelular sendo considerada um dos principais fatores biológicos que afetam a liberação de genes. Recentemente, estudos tem mostrado sua influência na transfecção celular de genes apresentado um papel duplo, ora atuando com um mediador para a transfecção celular, ora interagindo com os carreadores e diminuindo a transfecção celular, dependendo da estrutura e das cargas do carreador e das GAGs (RUPONEN et al., 2001).

Devido a estrutura molecular da OAM, com apenas um grupamento protonável por molécula, infere-se que sua ligação ao siRNA não seja tão forte quanto a ligação entre o siRNA e o PEI. Dessa forma, as NLCs preparadas com OAM podem ter interagido com as GAGs e, essa interação, promovido a descomplexação, resultando em uma ineficiente captação celular das moléculas de siRNA.

Estudos prévios mostraram que as NLCs compostas por MO:AO:FA foram capazes de complexar o siRNA a partir da incorporação de 0,2% de PEI e 2,0% de OAM e as NLC compostas por MO:FA a partir da incorporação de 0,2% de PEI e 0,4% de OAM. Em ambos os sistemas pode ser observado que o PEI mostrou-se mais eficiente em complexar o siRNA sendo necessário uma concentração de 10 e 2 vezes maior de OAM nos sistemas MO:AO:FA e MO:FA, respectivamente, para atingir o mesmo resultado (DEPIERI, 2012). Além disso, durante a padronização das condições experimentais para avaliação da integridade do siRNA após a formação dos complexos com as NLCs - ensaio de competição polianiônica com heparina, verificou-se que após a adição de heparina às NLCs preparadas com OAM, a descomplexação do siRNA era imediata. Por outro lado, a descomplexação do siRNA das NLCs preparadas com PEI era necessário um período de 1 h a 37 °C, o que sugere uma ligação mais forte do siRNA com o PEI que com a OAM. Esses resultados reforçam a hipótese da interação das NLCs preparadas com OAM e dos

complexos OAM:FA:siRNA-FAM com as GAGs resultarem em uma ineficiente captação celular das moléculas de siRNA devido a uma possível descomplexação.

Sendo o siRNA livre incapaz de se ligar ou atravessar as membranas celulares passivamente por ser uma macromolécula hidrofílica com carga residual negativa (GOODING et al., 2012), a captação celular do siRNA veiculado pelas NLCs contendo OAM é prejudicada. Pode-se, assim, inferir que o tipo de adjuvante catiônico usado no preparo da NLC resulta em diferenças na captação celular do siRNA-FAM. Devido aos resultados obtidos, as NLCs preparadas com OAM foram excluídas dos experimentos seguintes e, dentre as preparadas com o PEI, foi escolhida a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p). Esta escolha foi baseada na maior captação celular do siRNA obtida com o uso desta NLC, além de resultados prévios que mostraram uma melhor performance na promoção da penetração cutânea das moléculas de siRNA (DEPIERI, 2012).

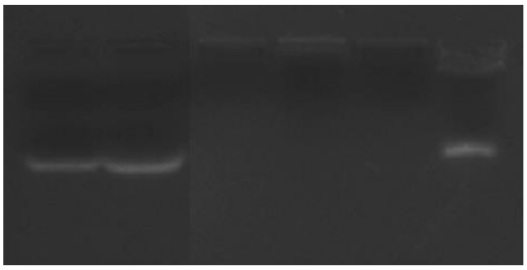
Os resultados obtidos reforçam a importância dos sistemas de liberação eficazes para a veiculação de siRNAs e a adequação da NLC preparada com PEI para este objetivo. Considerando que o silenciamento de um gene específico pelo mecanismo de RNAi depende da captação celular, tráfego intracelular, escape endossomal e liberação efetiva de moléculas intactas de siRNA do carreador, uma captação celular eficiente representa um passo importante nesse processo.

4.3. Avaliação da estabilidade do complexo NLC/siRNA

Na sequência dos processos envolvidos na eficácia de nanocarreadores na terapia com siRNA, após a internalização celular, o sistema carreador deve escapar do endossomo e atingir o citoplasma sem sofrer metabolização através da ação dos lisossomos. Finalmente, o sistema carreador deve liberar as moléculas de siRNA íntegras para exercerem sua função e, eficientemente, silenciar o gene alvo (KANASTY et al., 2012; ALABI et al., 2013).

Para assegurar que a NLC é um sistema de liberação adequado para o siRNA, a complexação, a integridade do siRNA após a formação dos complexos e sua estabilidade frente a RNase foram avaliadas utilizando eletroforese em gel de agarose. Esta técnica tem sido frequentemente utilizada para avaliar a eficiência de complexação e estabilidade do siRNA em diferentes tipos de sistemas de liberação (SHEN et al., 2011; BORGHETI-CARDOSO et al., 2014, 2015; WANG et al., 2014).

A heparina, molécula polianiônica, foi usada para competir com o siRNA e promover a sua liberação do sistema carreador. A **Figura 23** mostra que a NLC foi capaz de complexar o siRNA (10 μM); a adição de heparina promoveu a dissociação deste complexo e, o siRNA liberado permaneceu intacto como pode ser observado pela banda do siRNA no gel.



	1	2	3	4	5	6
siRNA 10 μM	+	+	–	–	+	+
Heparina	–	+	–	+	–	+
NLC	–	–	+	+	+	+

Figura 23 - Ensaio de eletroforese em gel de agarose para avaliação da eficiência de complexação e integridade do siRNA na NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) por meio do ensaio de competição com poliânion. siRNA 10 μM (faixa 1), siRNA 10 μM + heparina (faixa 2), NLC (faixa 3), NLC + heparina (faixa 4), NLC + siRNA 10 μM (faixa 5) e NLC + siRNA 10 μM + heparina (faixa 6).

A habilidade da NLC em proteger o siRNA da degradação enzimática foi avaliada em presença de RNase A durante 24 h a 37 °C. Como pode ser observado na **Figura 24A**, o siRNA livre (10 μM) foi completamente degradado após 30 min em contato com a RNase A (2 μg) o que corrobora com estudos prévios (ALIABADI et al., 2012). Entretando, o siRNA complexado com a NLC permaneceu intacto após 24 h em contato com a mesma dose de RNase A (**Figura 24B**).

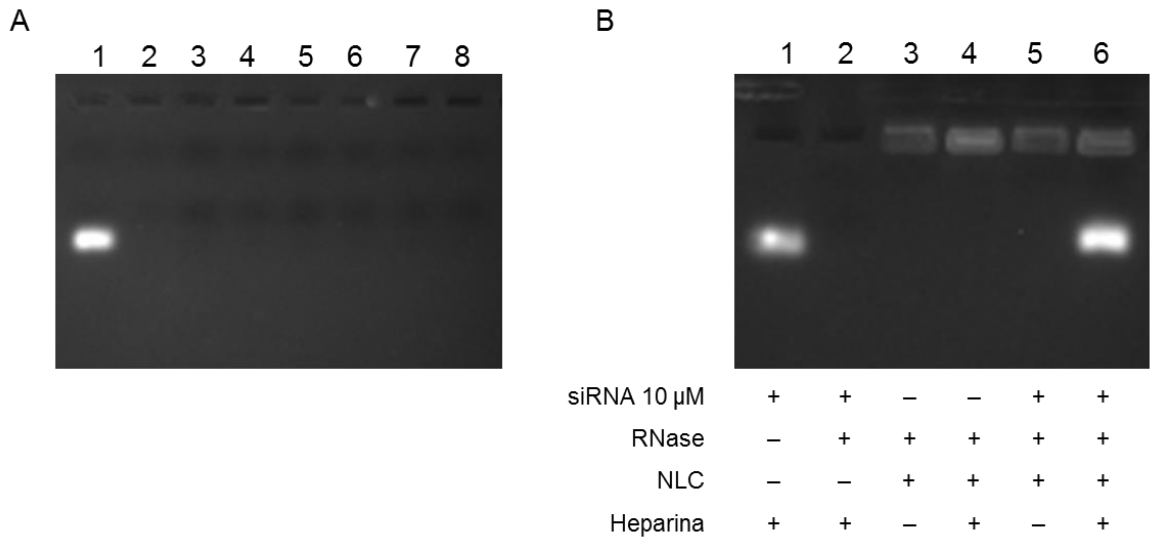


Figura 24 - Ensaio de eletroforese em gel de agarose para avaliação da estabilidade do siRNA em presença de RNase: [A] siRNA livre (faixa 1) e em presença de RNase (2 µg) em função do tempo: 30 min (faixa 2), 1 h (faixa 3), 3 h (faixa 4), 6 h (faixa 5), 12 h (faixa 6), 18 h (faixa 7), 24 h (faixa 8); [B] Avaliação da habilidade da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) em proteger o siRNA da degradação enzimática; siRNA 10 µM + heparina (faixa 1), siRNA 10 µM + RNase + heparina (faixa 2), RNase + NLC (faixa 3), RNase + NLC + heparina (faixa 4), siRNA 10 µM + RNase + NLC (faixa 5), siRNA 10 µM + RNase + NLC + heparina (faixa 6).

Os resultados demonstram a habilidade da NLC em proteger o siRNA da degradação enzimática e esta capacidade está associada a presença do PEI em sua composição. Sua estrutura ramificada confere alta proteção ao siRNA por dificultar estericamente o acesso da nuclease ao siRNA. Os resultados obtidos estão em conformidade com os reportados da literatura de sistemas de liberação contendo PEI em sua composição (LU; LIU; QI, 2011).

4.4. Avaliação da irritação cutânea da NLC em modelo de pele humana reconstruída por MTT e quantificação de IL-1α por ELISA

Após demonstrar que a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89 – p/p/p/p) promoveu uma alta captação celular e foi capaz de complexar e proteger as moléculas de siRNA da degradação enzimática, a próxima avaliação foi seu potencial de irritação cutânea usando o modelo de epiderme humana reconstruída.

A avaliação de irritação cutânea é um processo complexo e necessita, além da medição da viabilidade, a mensuração de possíveis reações metabólicas, tais como produção e liberação de citocinas. Em resposta a estresses físicos e/ou

químicos, os queratinócitos podem liberar várias substâncias, tais como: IL-1α, IL-8, TNF-α, IL-6, IL-7 e IL-15, *in vivo* (WELSS; BASKETTER; SCHRÖDER, 2004).

Dessa forma, para a avaliação do potencial de irritação cutânea após o tratamento tópico com a NLC, foi utilizado o ensaio de MTT para a verificação da viabilidade dos tecidos e a quantificação da liberação de IL-1α.

Ao fim de 12 h, os tecidos tratados com a NLC apresentaram valores de viabilidade de 82,3 ± 6,7% (**Figura 25A**), e uma liberação de 11,3 ± 3,3 pg/mL de IL-1α (**Figura 25B**). Estes valores não foram significativamente diferentes em comparação aos resultados obtidos após o tratamento com o controle PBS. Por outro lado, o tratamento com Triton X-100, considerado um irritante moderado, tal como determinado em ensaios de Draize (BAGLEY et al., 1999), reduziu significativamente a viabilidade dos tecidos (1,7 vezes e 1,5 vezes) após 5 h e (4,0 vezes e 3,6 vezes) após 12 h em comparação aos tratamentos com PBS e a NLC, e aumentou significativamente os níveis liberados de IL-1α (17.1-, 17.5-, 15,6 vezes) em todos os momentos avaliados. O tempo de exposição necessário para o Triton X-100 reduzir a viabilidade dos tecidos a 50% (ET_{50}) foi de 6,9 h. ET_{50} da NLC não pôde ser calculado uma vez que a viabilidade do tecido não foi reduzida abaixo de 82,3%, demonstrando que a NLC deve ser melhor tolerada pela pele que o Triton X-100.

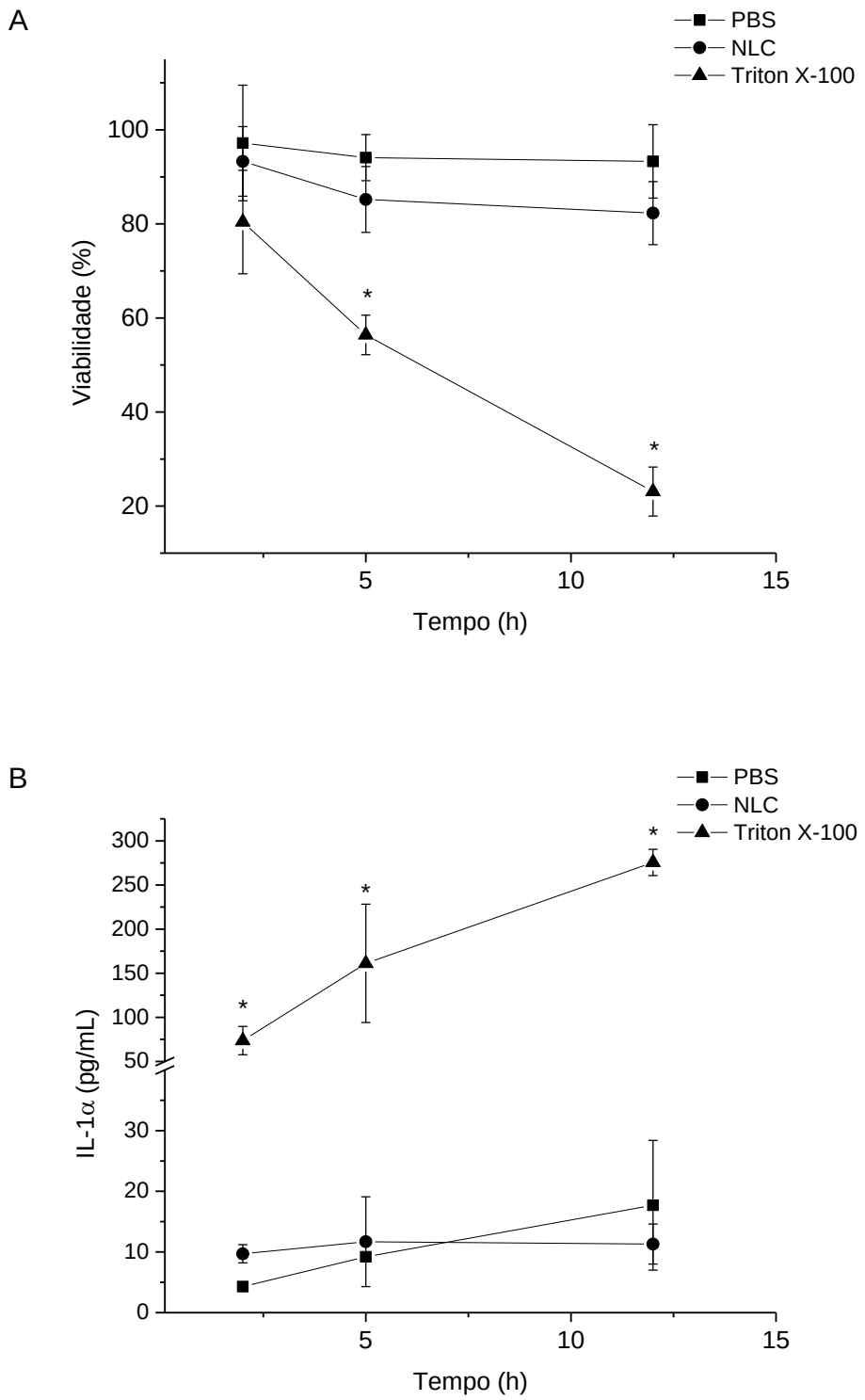


Figura 25 - [A] Viabilidade dos tecidos da epiderme humana reconstruída (EpiDerm™) e [B] níveis extracelulares de IL-1α após tratamento tópico da EpiDerm™ com a NLC composta por MO:OA:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) e controles: PBS e Triton X-100 por 2, 5 e 12 h. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. A análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação aos tratamentos PBS e NLC.

De acordo com a “Declaração sobre a validade dos ensaios *in vitro* de irritação cutânea” do Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM), a substância teste é considerada não irritante para a pele, se a viabilidade do tecido após 15 min de exposição e 42 h de incubação pós-tratamento é superior a 50% e a quantidade de IL-1α liberada é menor ou igual a 60 pg/mL (HARTUNG, 2007). Os resultados obtidos com o tratamento com a NLC estão dentro das especificações recomendadas (mesmo com o tempo de exposição superior ao especificado nas orientações), e a formulação pode ser considerada segura para a pele. Além disso, isto garante que os possíveis efeitos terapêuticos (silenciamento gênico), tal como descrito na seção seguinte, não estão relacionados com um decréscimo na viabilidade dos tecidos.

Após o primeiro ensaio para avaliação do potencial de irritação cutânea da NLC por 2, 5 e 12 h, foi proposta uma nova avaliação, onde os tratamentos simulariam uma aplicação por dias consecutivos, pois muitas doenças que afetam a pele são crônicas, como a psoríase, e necessitam de um regime terapêutico prolongado. Dessa forma, foram avaliados a viabilidade dos tecidos e a liberação de IL-1α após o tratamento tópico com a NLC e controles por 6 h seguido da remoção dos tratamentos e incubação por 18 h durante 3 dias. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 26**.

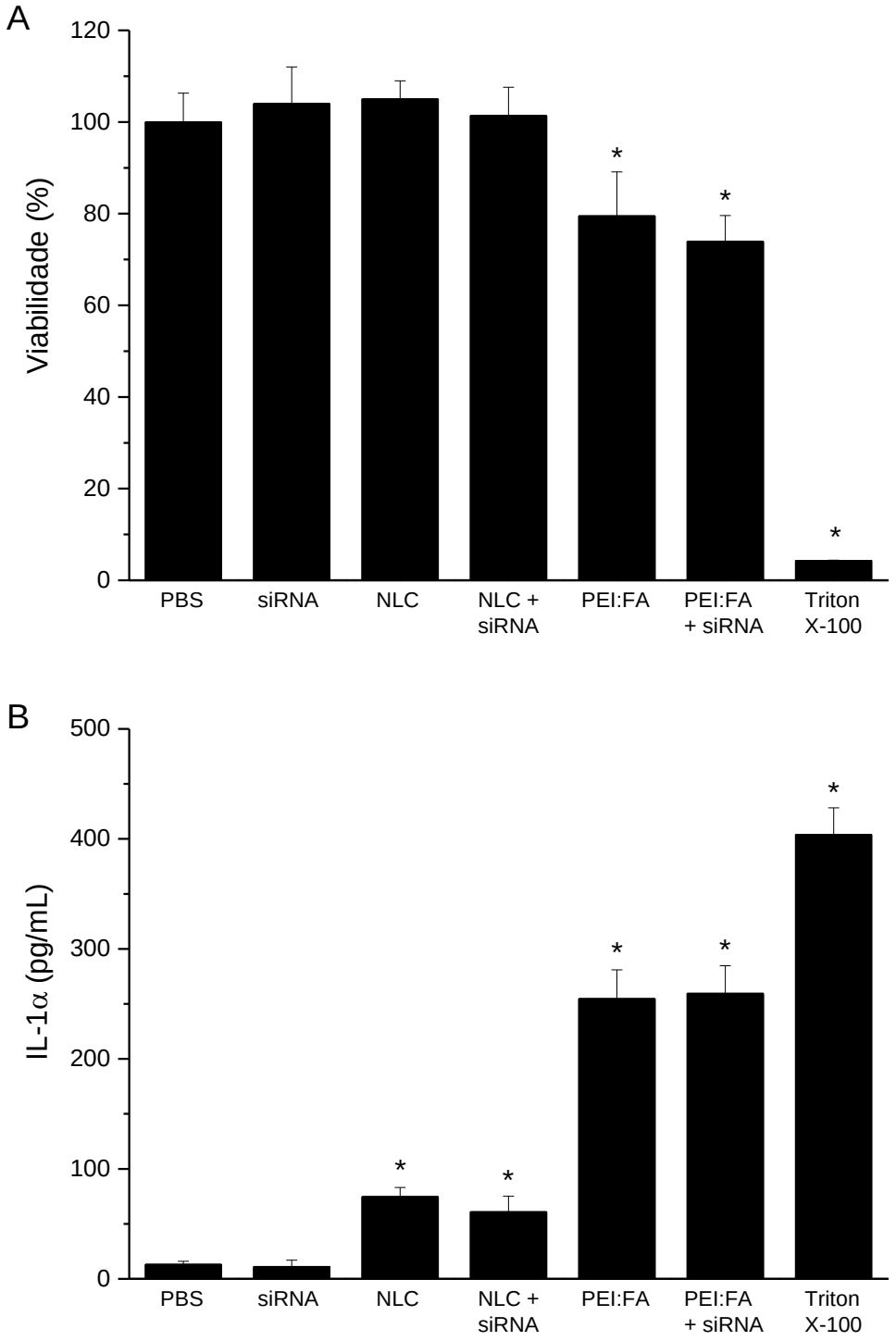


Figura 26 - [A] Viabilidade dos tecidos da epiderme humana reconstruída (EpiDerm™) e [B] níveis extracelulares IL-1α após tratamento tópico da EpiDerm™ com a NLC composta por MO:OA:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) sem e com siRNA controle, solução de PEI:FA sem e com siRNA controle, PBS, siRNA controle e Triton X-100 por 3 dias (6 h de incubação com os tratamentos seguido da incubação por 18 h sem os tratamentos). siRNA controle na concentração final de 10 μM. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. A análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey, *$p<0,05$ em relação ao tratamento PBS.

Ao fim de 3 dias, os tecidos tratados com a NLC apresentaram valores de viabilidade de 105,0 ± 4,0% (**Figura 26A**), e uma liberação de 74,7 ± 8,5 pg/mL de IL-1α (**Figura 26B**). O siRNA complexado com a NLC não alterou significativamente os valores de viabilidade e níveis liberados de IL-1α que foram de 101,4 ± 6,2% e 60,9 ± 14,1 pg/mL. Embora não sejam estabelecidos os parâmetros para a classificação de substâncias como irritante e não irritante após um tratamento por dias consecutivos, pode-se inferir, com os resultados obtidos, que o tratamento com a NLC deve ser bem tolerado pela pele, pois a viabilidade está acima de 50% e os níveis de IL-1α no limite dos estabelecidos para uma curta aplicação.

O tratamento com uma solução de siRNA na mesma concentração daquela incorporada à NLC apresentou uma viabilidade de 104,0 ± 8,0% e uma liberação de 11,1 ± 5,9 pg/mL, valores semelhantes aos obtidos pelo controle PBS e que sugerem que o siRNA não é irritante para a pele nas condições avaliadas.

Os tratamentos com PEI:FA e o complexo PEI:FA + siRNA, na mesma concentração utilizada para o preparo da NLC, apresentaram uma viabilidade de 79, 5 ± 9,6% e 73,9 ± 5,7% e uma liberação de IL-1α de 254,6 ± 26,4 e 259,9 ± 25,2 pg/mL, respectivamente. Embora os níveis liberados de IL-1α tenham sido, aproximadamente, 20 vezes maior que o obtido com o controle PBS e, aproximadamente, 4,3 vezes maior que a estabelecida pela ECVAM, a viabilidade encontra-se acima de 50%. Dessa forma, pode-se inferir que o tratamento tópico com o PEI não deve ser tão bem tolerado pela pele quanto o tratamento com a NLC.

Por outro lado, o tratamento com Triton X-100 reduziu significativamente a viabilidade dos tecidos (~ 25 vezes) e aumentou significativamente os níveis liberados de IL-1α (31,0 e 5,5 vezes), em comparação com os tratamentos PBS e NLC sendo sua aplicação tópica considerada irritante para a pele.

Os resultados obtidos corroboram com os testes de irritação *in vivo* previamente realizados em camundongos sem pêlo que foram expostos ao tratamento tópico durante 24 e 48 h com a nanodispersão líquido-cristalina composta por MO:OA:PEI:FA (8:2:5:85, p/p/p/p) complexada com siRNA. Este trabalho demonstrou que esta formulação não é irritante para a pele uma vez que não foi constatada migração de células inflamatórias nas camadas da pele e houve manutenção da espessura da epiderme (VICENTINI et al., 2013b). Também pode-se inferir que os possíveis efeitos terapêuticos (silenciamento gênico), tais como descritos na seção seguinte, com a aplicação dos tratamentos por 3 dias

consecutivos, não estão relacionados com um decréscimo na viabilidade dos tecidos.

De acordo com outros estudos realizados utilizando modelo de pele reconstruída para avaliar o potencial de irritação de nanopartículas (PARK et al., 2011; HOSMER; STEINER; LOPES, 2013) e cosméticos (FALLER et al., 2002), este estudo destaca a aplicabilidade e boa correlação com experimentos *in vivo* para a avaliação do potencial de irritação cutânea de substâncias e formulações aplicadas topicamente sem o uso de modelos animais.

4.5. Avaliação da eficácia do silenciamento da IL6 em modelo de pele humana psoriática após o tratamento com a NLC veiculando siRNA IL6

Recentemente, a tecnologia de cultura de tecidos tem sido usada no desenvolvimento *in vitro* de modelos de doenças de pele possibilitando a investigação da ação de fármacos, adjuvantes farmacêuticos, bem como formulações convencionais e inovadoras (SEMLIN et al., 2011).

Utilizando-se desta tecnologia, o modelo de pele humana psoriática foi utilizado neste trabalho para a avaliação da eficácia do siRNA veiculado pela NLC em promover a redução dos níveis da citocina IL-6. Como grupos controle, foram utilizados siRNA *IL6* (10 μM) em água livre de RNase, NLC isenta de siRNA *IL6* e um complexo de PEI:FA com siRNA *IL6* (10 μM). Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 27**.

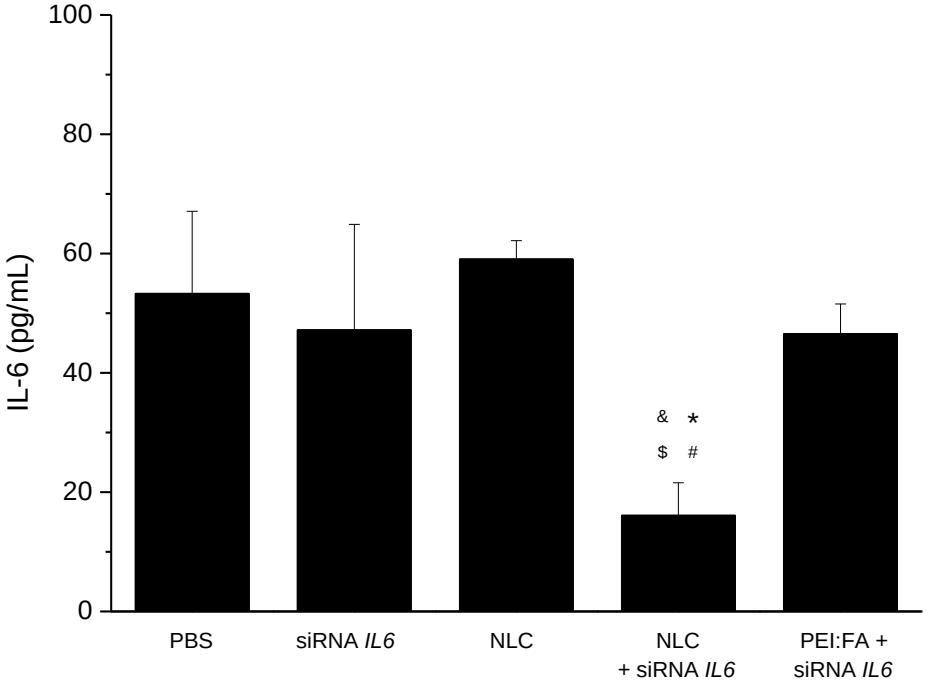


Figura 27 - Níveis extracelulares de IL-6 quantificados por ELISA após o tratamento dos tecidos de pele psoriática por 6 h com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *IL6* e os controles: PBS, siRNA *IL6* em água livre de RNase, NLC isenta de siRNA *IL6* e complexo PEI:FA (1:99, p/p) com siRNA *IL6*. siRNA *IL6* na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média de 4-6 determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; $^{\&}$p<0,05 em relação ao grupo siRNA *IL6*; $^{\$}$p<0,05 em relação ao grupo NLC; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo PEI:FA + siRNA *IL6*.

Pode-se observar que um único tratamento com a NLC contento siRNA *IL6* por 6 h foi capaz de reduzir significativamente os níveis extracelulares de IL-6. Este tratamento levou a uma redução acentuada (~ 70%) nos níveis de IL-6 (16,1 ± 5,5 pg/mL). Este valor foi 68,8 e 72,7% menor que os níveis de IL-6 após os tratamentos com PBS e a NLC sem siRNA (p<0,05), respectivamente, e 65,4% menor que os níveis de IL-6 após os tratamentos com a solução de siRNA IL-6 e o complexo de PEI:FA + siRNA IL-6 (p<0,05). O controle complexo PEI:FA + siRNA *IL6*, embora tenha apresentado uma alta taxa de captação celular (~ 95%), não foi capaz de promover o silenciamento da IL-6 nos tecido avaliados. A inabilidade do complexo em ultrapassar a barreira do EC e promover a penetração das moléculas de siRNA (DEPIERI, 2012) justifica os resultados acima obtidos e ressaltam a necessidade e importância da veiculação das moléculas de siRNA em um sistema de liberação, bem como a habilidade da NLC em ultrapassar a barreira do EC, promover a

captação celular e liberar o siRNA dentro das células para exercer sua função e eficientemente silenciar o gene alvo. Devido a este resultado, o controle complexo PEI:FA + siRNA *IL6* foi excluído dos experimentos seguintes.

Após os resultados de silenciamento obtidos anteriormente foi realizado um estudo subsequente com o objetivo de avaliar o comportamento da NLC em duas novas propostas de tratamento: (i) 24 h: tratamento por 6 h com a NLC + siRNA *IL6* e posterior incubação dos tecidos sem o tratamento por 18 h (**Figura 28**); (ii) 72 h: tratamento de 6 h com a NLC + siRNA *IL6* e posterior incubação dos tecidos sem tratamento por 18 h, por 3 dias consecutivos (**Figura 29**). A primeira proposta possui o objetivo de avaliar os efeitos ocorridos após a remoção dos tratamentos e a segunda proposta, de avaliar os efeitos de uma aplicação prolongada dos tratamentos.

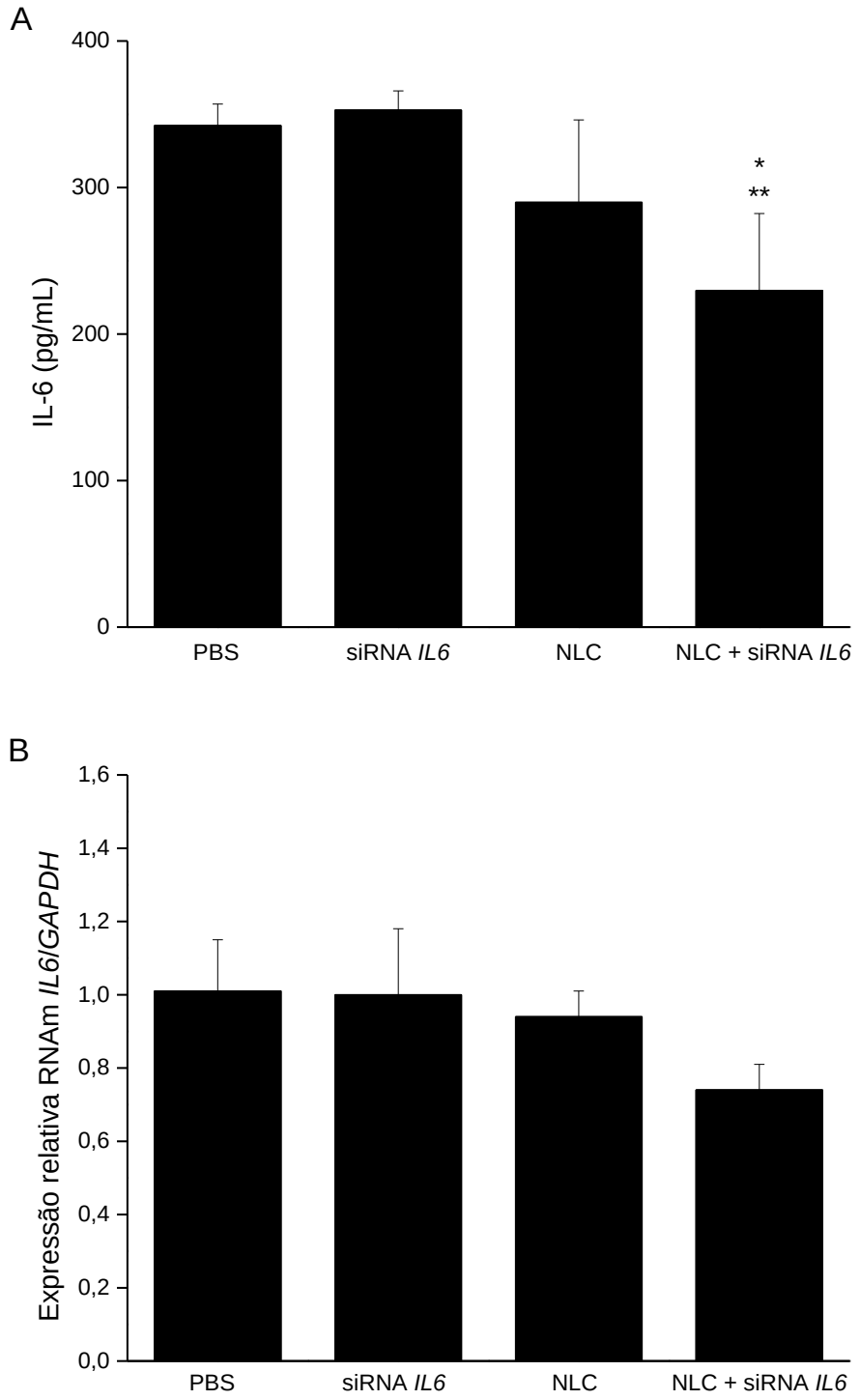


Figura 28 - Níveis extracelulares de IL-6 quantificados por ELISA e níveis do RNAm *IL6* quantificados por qRT-PCR após o tratamento dos tecidos de pele psoriática por 24 h (6 h incubação com as formulações e 18 h incubação sem as formulações) com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *IL6* e os controles: PBS, siRNA *IL6* em água livre de RNase e NLC isenta de siRNA *IL6*. siRNA *IL6* na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo siRNA *IL6*.

Pode-se observar que o tratamento dos tecidos psoríaticos com a NLC contendo siRNA *IL6* por 24 h (6 h incubação com as formulações e 18 h incubação sem as formulações) também foi capaz de reduzir significativamente os níveis extracelulares de IL-6. Este tratamento levou a uma redução menos pronunciada (~ 35%) que a redução de 70% obtida com o tratamento por 6 h nos níveis de IL-6 (229,8 pg/mL). Este valor foi 32,9 e 34,9% menor que os níveis de IL-6 após os tratamentos com PBS e o siRNA *IL6* em solução ($p<0,05$), respectivamente, e 20,7% menor que os níveis de IL-6 após o tratamento com a NLC sem siRNA. Também foi observado uma redução de 26,0, 26,0 e 21,3% nos níveis do RNAm *IL6* após o tratamento com a NLC contendo siRNA *IL6* comparado com os tratamentos PBS, siRNA *IL6* em solução e a NLC isenta de siRNA *IL6*, respectivamente. Porém, a redução nos níveis do RNAm *IL6* não foi significativa comparada aos controles utilizados.

Uma hipótese para explicar a redução menos eficiente dos níveis extracelulares de IL-6 após 24 h (~ 35%) em comparação com a redução obtida após o tratamento por 6 h (~ 70%) pode estar associada ao modelo utilizado no estudo. Neste modelo, os tecidos permanecem metabolicamente ativos onde, tanto as células que não foram transfectadas com a NLC contendo siRNA *IL6* continuariam produzindo IL-6 como também poderia ser observado um decréscimo da efetividade do silenciamento nas células transfectadas decorrente da degradação das moléculas de siRNA após um tempo e, portanto, permitindo que a célula volte a produzir IL-6 que é liberado no meio de cultivo. Dessa forma, resultando em uma redução nos níveis de IL-6 menos eficiente.

Após os resultados obtidos, foi avaliada a proposta de tratamento com a NLC contendo siRNA *IL6* por 3 dias consecutivos para avaliarmos os efeitos de uma aplicação prolongada dos tratamentos (**Figura 29**).

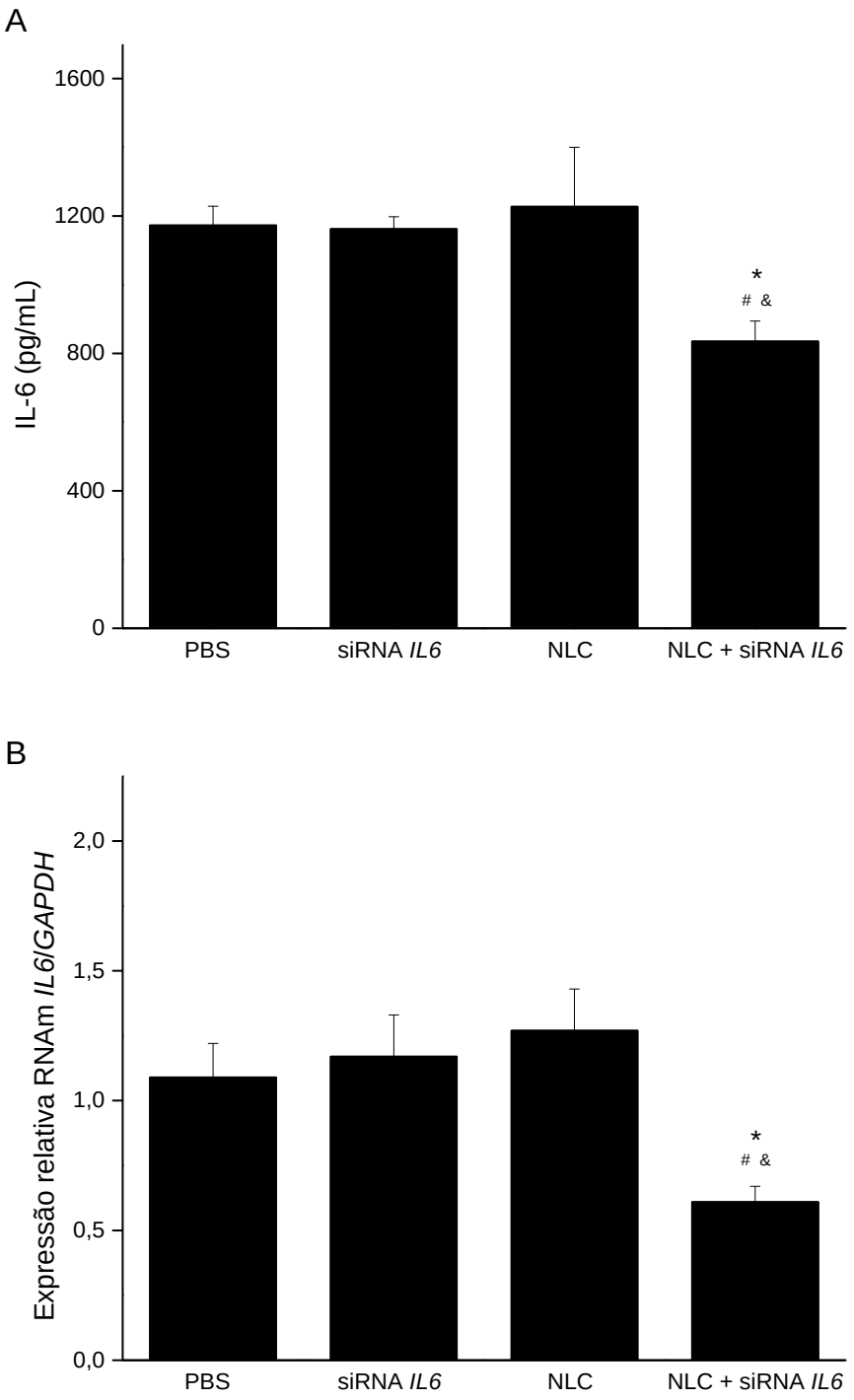


Figura 29 - Níveis extracelulares de IL-6 quantificados por ELISA e níveis do RNAm *IL6* quantificados por qRT-PCR após o tratamento dos tecidos de pele psoriática por 72 h (6 h incubação com as formulações e 18 h incubação sem as formulações por 3 dias consecutivos) com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *IL6* e os controles: PBS, siRNA *IL6* em água livre de RNase e NLC isenta de siRNA *IL6*. siRNA *IL6* na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *$p<0,05$ em relação ao grupo PBS; $^{\#}p<0,05$ em relação ao grupo siRNA *IL6*; $^{\&}p<0,05$ em relação ao grupo NLC.

Pode-se observar que o tratamento dos tecidos psoríaticos com a NLC contendo siRNA *IL6* por 72 h (6 h incubação com as formulações e 18 h incubação sem as formulações por 3 dias consecutivos) também foi capaz de reduzir significativamente os níveis extracelulares de IL-6. Este tratamento levou a uma redução similar à obtida com o tratamento por 24 h nos níveis de IL-6 (889,0 pg/mL). Este valor foi 28,8, 28,2 e 31,9% menor ($p<0,05$) que os níveis de IL-6 após os tratamentos com PBS, solução de siRNA *IL6* e a NLC, respectivamente. Também foi observada uma redução significativa de 44,0, 48,0 e 52,0% nos níveis do RNAm *IL6*, após o tratamento com a NLC contendo siRNA *IL6*, comparado aos tratamentos PBS, siRNA *IL6* em solução e a NLC isenta de siRNA *IL6*, respectivamente.

Os resultados obtidos com esta proposta de tratamento resultaram em uma redução mais efetiva dos níveis de IL-6 e sugerem que o regime terapêutico prolongado e com múltiplas aplicações é o mais adequado para o tratamento de doenças cutâneas crônicas, como a psoríase. Vale ressaltar, como discutido anteriormente, que os tecidos utilizados nesse estudo são metabolicamente ativos, o que implica na continuação da produção de IL-6 pelas células não transfectadas. Também é relevante ressaltar que o modelo *in vitro* empregado possui outras citocinas pró-inflamatórias e genes envolvidos na psoríase com a expressão elevada. Deve-se ponderar que apenas um alvo molecular está sendo silenciado neste modelo, sendo que a influência dos demais na manutenção da doença permanece ativa e relacionada ao estimulo da produção de IL-6. Outro ponto importante que deve ser ressaltado é a ausência de dados sobre os níveis do RNAm *IL6* após os tratamentos por 6 h, o que dificulta a comparação entre os resultados obtidos entre os diferentes tratamentos realizados.

De modo geral, os resultados obtidos mostram a eficácia do tratamento tópico com a NLC veiculando siRNA *IL6* em dois momentos distintos, sendo o primeiro correspondente a um processo inflamatório agudo (após 6 h de tratamento) e o segundo, a um processo inflamatório crônico (após tratamento por 3 dias consecutivos). Estudos adicionais para avaliar outras doses de siRNA, como também outros regimes terapêuticos, podem auxiliar na discussão desses resultados. Contudo, os resultados obtidos destacam a importância da NLC desenvolvida para uma liberação eficiente de moléculas de siRNA para o tratamento de doenças cutâneas.

4.6. Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pela NLC em macrófagos por citometria de fluxo e por microscopia confocal de varredura a laser

A internalização celular das moléculas de siRNA é considerada uma etapa limitante no processo de silenciamento por RNAi (VADER et al., 2010). Dessa forma, a avaliação da habilidade da NLC em promover a captação celular das moléculas de siRNA em macrófagos da linhagem J774, células utilizadas no modelo de inflamação *in vitro* proposto, foi determinada por citometria de fluxo e por microscopia confocal de varredura a laser.

A captação celular das moléculas de siRNA-FAM, após o tratamento durante 24 h com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p), foi de 77,5 ± 0,7%, enquanto o tratamento com siRNA-FAM em solução resultou em uma captação de 0,28 ± 0,04%, como mostra a **Figura 30**. Semelhante ao ocorrido nos fibroblastos da linhagem L292, a NLC foi capaz de promover uma alta captação celular das moléculas de siRNA, que foi mais eficiente que o reagente de transfecção comercial Lipofectamina 2000, utilizado como controle.

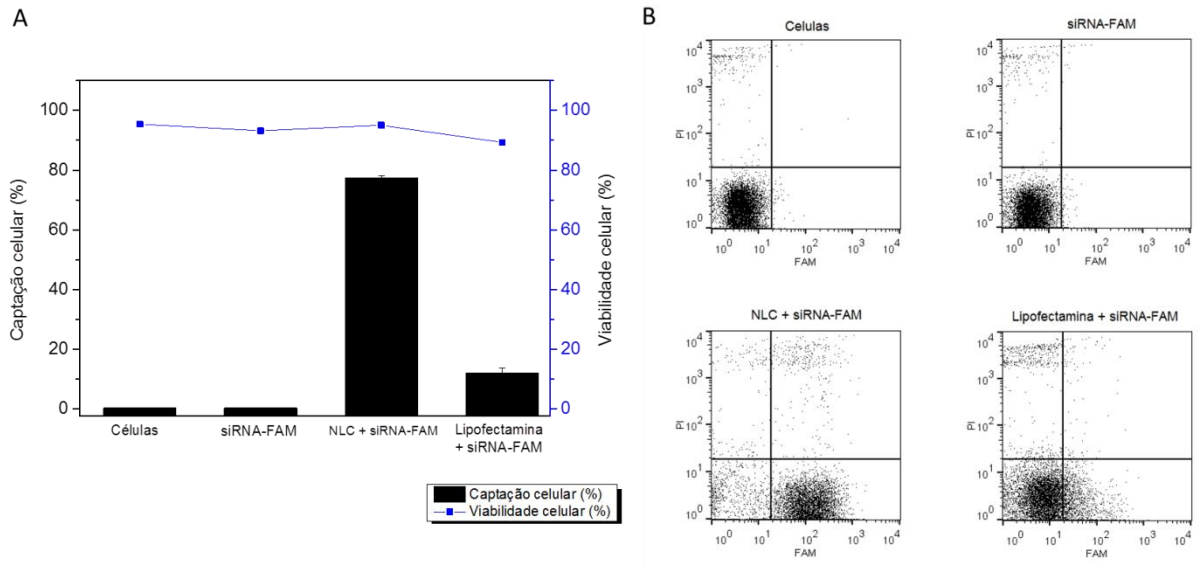


Figura 30 - [A] Captação e viabilidade celular; [B] Dot plot representativo do siRNA-FAM, NLC (MO:AO:PEI:FA – 8:2:1:89, p/p/p/p) com siRNA-FAM e a Lipofectamina 2000 com siRNA-FAM determinado por citometria de fluxo. siRNA-FAM na concentração final de 45 nM/poço (dose de 7,5 pmol/poço/1x10^5 células). Resultados representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão.

Os resultados obtidos por microscopia confocal corroboram com os resultados obtidos por citometria de fluxo, como mostra a **Figura 31**.

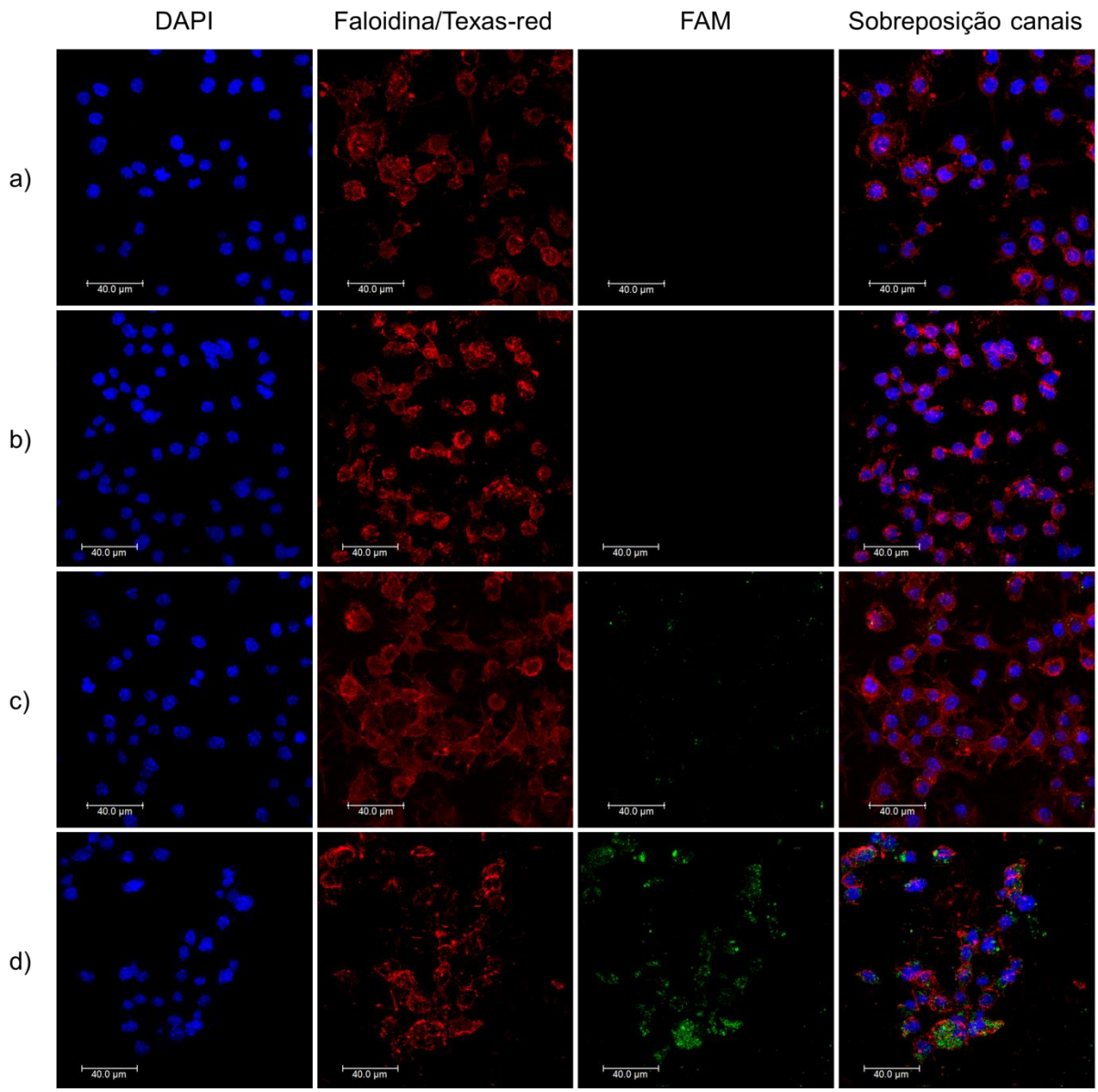


Figura 31 - Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de macrófagos da linhagem J774 tratados por 24 h com a) PBS; b) solução de siRNA-FAM em água livre de RNase; c) Lipofectamina veiculando siRNA-FAM; d) NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) veiculando siRNA-FAM. siRNA-FAM na concentração final de 45 nM/poço (dose de 7,5 pmol/poço/1x10^5 células). As imagens representam a sobreposição máxima de secções ópticas *xy* em função da profundidade (*z*). As células fixadas foram coradas com DAPI e Faloidina/Texas-red para visualização do núcleo (azul) e F-actina (vermelho), respectivamente. Lasers: UV (405 nm), emissão: 420 – 516 nm (azul); Visível (488 nm), emissão: 494 – 599 nm (verde); Visível (552 nm), emissão: 593 – 698 nm (vermelho). Objetiva 63X, barra: 40 µm.

Como mostra a linha b da **Figura 31**, as moléculas de siRNA-FAM não são capazes de sofrer internalização de forma passiva pelas células, devido suas propriedades físico-químicas (macromolécula hidrófila, peso molecular elevado e carga negativa). Entretanto, quando veiculadas pela Lipofectamina (linha c) e pela NLC (linha d) foi possível observar sua internalização celular, porém, mais pronunciada com o uso NLC. Assim, os resultados obtidos reforçam a importância do uso de carreadores eficazes para siRNAs e a adequação da NLC para este objetivo.

4.7. Desenvolvimento de modelo in vitro de inflamação para avaliação da eficácia do tratamento com a NLC veiculando siRNA Tnf

Modelos *in vitro* são ferramentas de grande importância no desenvolvimento racional de sistemas carreadores de siRNA, uma vez que possibilitam a avaliação da efetividade do carreador durante as etapas envolvidas no processo de RNAi (promoção da captação celular, escape endossomal, liberação das moléculas de siRNA no citoplasma e o silenciamento gênico). Dessa forma, foi proposto o desenvolvimento de um modelo *in vitro* para a avaliação da habilidade da NLC, como sistema carreador de siRNA, em promover a liberação funcional dessas moléculas em macrófagos, células estas que desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase e regulação da resposta inflamatória do organismo, sendo consideradas alvo celular relevante para melhorar o prognóstico de doenças inflamatórias (BAK; MIKKELSEN, 2010; SINGH et al., 2014; PEI; YEO, 2015) e, no caso da psoríase, são considerados a principal fonte de TNF-α (COIMBRA et al., 2012).

O modelo *in vitro* de inflamação proposto para avaliação da atividade silenciadora do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC foi desenvolvido em macrófagos da linhagem J774, que foram estimulados com LPS. O tratamento dos macrófagos com LPS provoca uma variedade de eventos de sinalização, que culminam na ativação das funções efetoras dos macrófagos, incluindo a produção de citocinas, quimiocinas e outros importantes sinais de comunicação para a coordenação da resposta inflamatória (BODE; EHLTING; HÄUSSINGER, 2012).

4.7.1. Avaliação da eficiência de complexação de diferentes doses de siRNA Tnf pela NLC

Para assegurar que todas as doses de siRNA *Tnf* avaliadas foram capazes de ser complexadas pela NLC, um ensaio de eletroforese foi realizado. A **Figura 32** mostra que a NLC diluída em PBS foi capaz de complexar siRNA *Tnf* em todas as doses avaliadas, devido a ausência de suas respectivas bandas no gel após a complexação. Esses resultados comprovam a habilidade da NLC em complexar diferentes doses de siRNA e possibilitam sua utilização nos experimentos de silenciamento gênico *in vitro* e a correlação do efeito obtido com a dose de siRNA utilizada.

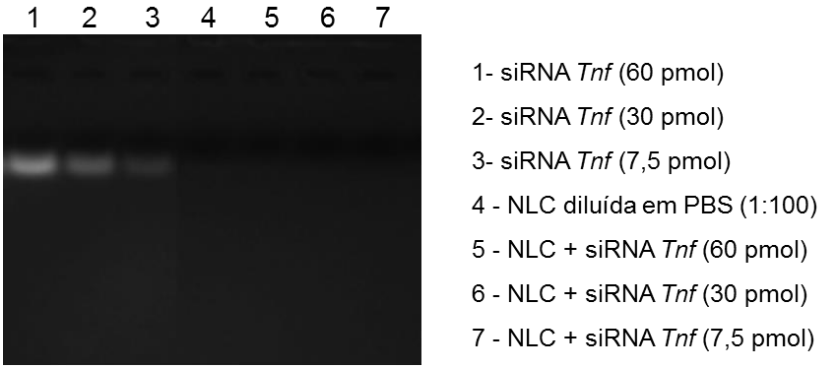


Figura 32 - Ensaio de eletroforese em gel de agarose para avaliação da eficiência de complexação de diferentes doses de siRNA *Tnf* pela NLC (MO:AO:PEI:FA - 8:2:1:89, p/p/p/p) diluída em PBS (1:100) utilizadas do experimento *in vitro* de silenciamento gênico.

4.7.2. Avaliação da citotoxicidade

Para garantir que uma possível redução dos níveis do RNAm *Tnf* fosse resultado da ação do siRNA específico para o bloqueio da tradução dessa citocina e não o resultado de uma redução na viabilidade celular, um estudo para avaliar a citotoxicidade dos tratamentos com a NLC e Lipofectamina, sem e com siRNA e, em associação ao LPS, foram realizados utilizando o ensaio de MTT. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 33**.

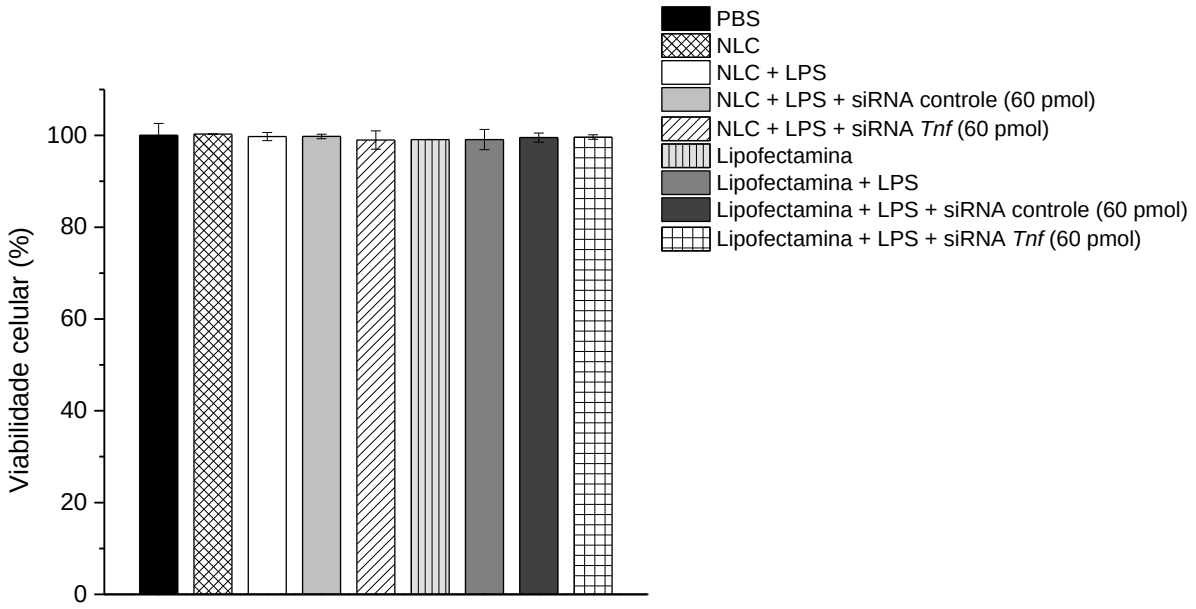


Figura 33 - Efeito da NLC (MO:AO:PEI:FA - 8:2:1:89, p/p/p/p), sem ou com siRNA controle ou *Tnf* e da Lipofectamina sem ou com siRNA controle ou *Tnf* e em associação ao LPS (500 ng mL^{-1}/poço) sobre a viabilidade celular dos macrófagos da linhagem J774. siRNA controle ou *Tnf* na dose final de 60 pmol/poço/$1x10^5$ células. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey.

A viabilidade celular após o tratamento com PBS (controle negativo), NLC e Lipofectamina durante 24 h foi de 100,0 ± 2,6%, 100,3 ± 0,02 e 99,1 ± 0,01%, respectivamente. A associação desses tratamentos com LPS e a adição de siRNA controle ou *Tnf*, na maior dose utilizada nos experimentos de silenciamento gênico *in vitro*, não alteraram a viabilidade de forma significativa ($p<0,05$). Com base nestes resultados, pode-se sugerir que os tratamentos com a NLC e Lipofectamina podem ser considerados seguros e o estímulo celular com LPS não causa morte celular. Dessa forma, podemos garantir a viabilidade celular nos ensaios de silencimento e que os possíveis efeitos na redução dos níveis do RNAm *Tnf* serão decorrente da ação do siRNA específico para esta citocina.

4.7.3. Avaliação da eficácia do siRNA Tnf veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm Tnf por qRT-PCR

A capacidade de indução da produção de TNF-α com LPS e a capacidade de diferentes doses de siRNA *Tnf* veiculados pela NLC e pela Lipofectamina em reduzir os níveis do RNAm *Tnf* foram avaliadas após o tratamento concomitante dos macrófagos com LPS e as formulações por 6 h (**Figura 34**).

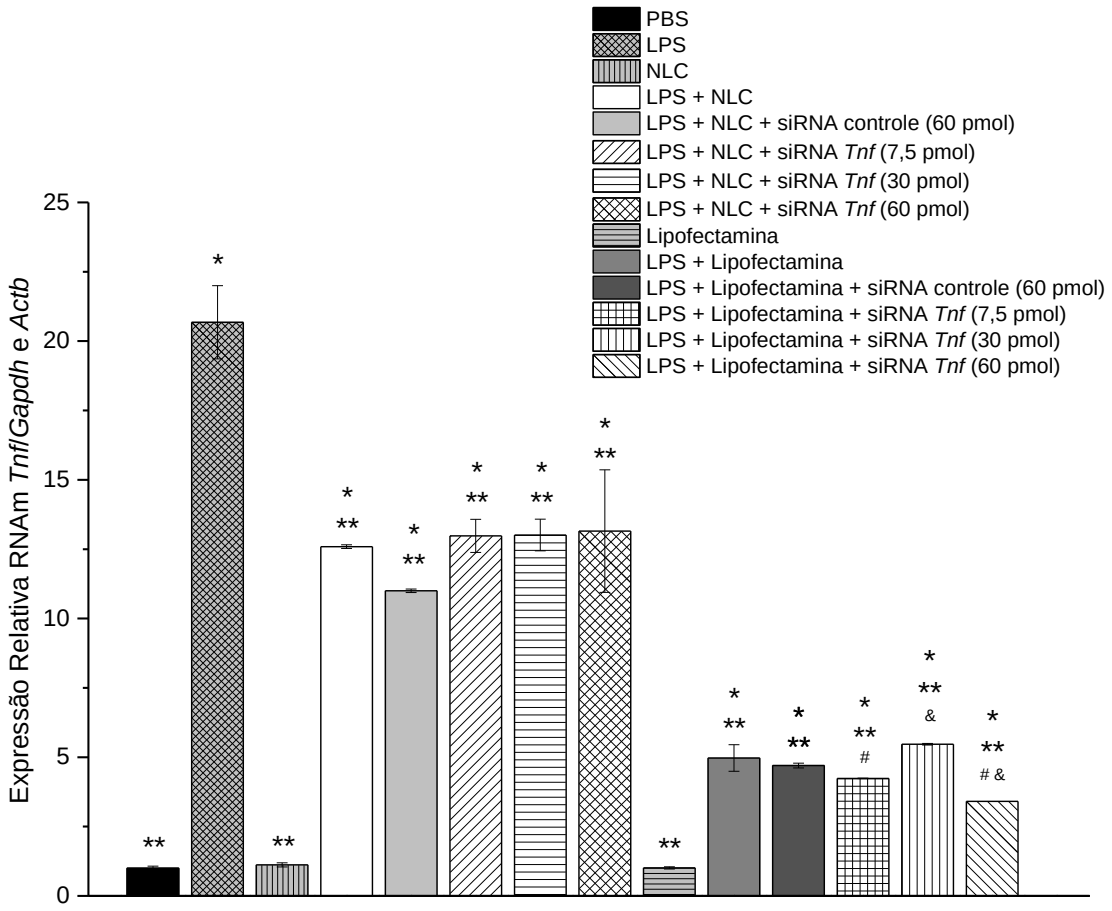


Figura 34 - Níveis do RNAm *Tnf* quantificados por qRT-PCR após o tratamento concomitante dos macrófagos da linhagem J774 por 6 h com LPS e a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) ou Lipofectamina isentas de siRNA e contendo siRNA controle (60 pmol) ou diferentes doses de siRNA *Tnf* (7,5, 30 e 60 pmol). Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo LPS; #p<0,05 em relação ao grupo LPS + Lipofectamina; &p<0,05 em relação ao grupo LPS + Lipofectamina + siRNA controle (60 pmol).

Pode-se observar que o tratamento dos macrófagos apenas com a NLC ou com a Lipofectamina por 6 h não induziram um processo inflamatório nas células, pois não há diferença significativa em comparação ao controle PBS. Entretanto, o tratamento com LPS proporcionou um aumento significativo dos níveis do RNAm *Tnf*, em 20,68 vezes, enquanto os tratamentos com a NLC e a Lipofectamina em associação ao LPS por 6 h, também proporcionaram aumento significativo dos níveis do RNAm *Tnf* em 12,59 e 4,97 vezes. Embora tenha ocorrido uma redução da

ação do LPS quando em associação às formulações, houve indução de processo inflamatório celular. Uma hipótese para explicar esse resultado seria a possível interação dos lipídios constituintes das formulações com a membrana citoplasmática, dificultando a ligação do LPS aos seus receptores de membrana e/ou modificando sua fluidez e, com isso, reduzindo sua ação. Resultados similares foram descritos na literatura onde o pré-tratamento de macrófagos da linhagem J774 com nanopartículas lipídicas isentas de fármaco inibiram a produção de TNF-α após o estímulo com LPS (BELOQUI et al., 2013) e que o aumento da fluidez da membrana citoplasmática inibiu a associação do *toll like-receptor* 4 (TLR-4) aos *lipid-rafts*, suprimindo a indução de TNF-α pelo LPS (DAI; PRUETT, 2006). Também pode-se observar que o tratamento com Lipofectamina apresentou maior interferência na ação do LPS em comparação à NLC. A interferência de lipídios policatiônicos, como a Lipofectamina, na ação do LPS foi descrita na literatura como resultado do desacoplamento de componentes dos receptores de membrana do LPS, o que inibe a resposta pró-inflamatória, devido à interrupção na cascata de sinalização (LEON-PONTE et al., 2005), o que pode explicar os resultados acima obtidos.

Os tratamentos com a NLC ou Lipofectamina veiculando siRNA controle não apresentaram diferenças significativas comparado ao grupo NLC ou Lipofectamina sem siRNA. O siRNA controle é uma sequência composta por 19-21 pares de bases, que não está relacionada a nenhum gene endógeno e é usada para identificar possíveis efeitos adversos e silenciamento não específico, que poderiam ser causados pelo processo de transfecção de siRNAs. Os resultados obtidos mostram que não foi observado redução dos níveis do RNAm *Tnf* por um processo de silenciamento gênico não específico. Também pode-se observar que os tratamentos com a NLC veiculando siRNA específico para o alvo *Tnf* em diferentes doses, não foi capaz de reduzir os níveis do RNAm que codificam essa citocina. Por outro lado, o tratamento com Lipofectamina veiculando siRNA *Tnf* nas doses de 7,5 e 60 pmol ocasionaram uma redução significativa dos níveis do RNAm *Tnf* de 18,6 e 39,5%, respectivamente, comparado ao tratamento Lipofectamina + LPS. O tratamento com Lipofectamina + siRNA *Tnf* (60 pmol) também reduziu significativamente os níveis do RNAm *Tnf* em comparação ao tratamento com Lipofectamina veiculando siRNA controle, na mesma dose, em 35,1%. Neste protocolo experimental proposto, a Lipofectamina mostrou-se mais eficaz em reduzir os níveis do RNAm *Tnf* que a NLC. Desse modo, foi proposto a avaliação dos níveis do RNAm *Tnf* após os tratamentos

concomitantes de LPS com a NLC ou Lipofectamina por 24 h, para verificar a influência do tempo de tratamento no silenciamento dessa citocina. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 35**.

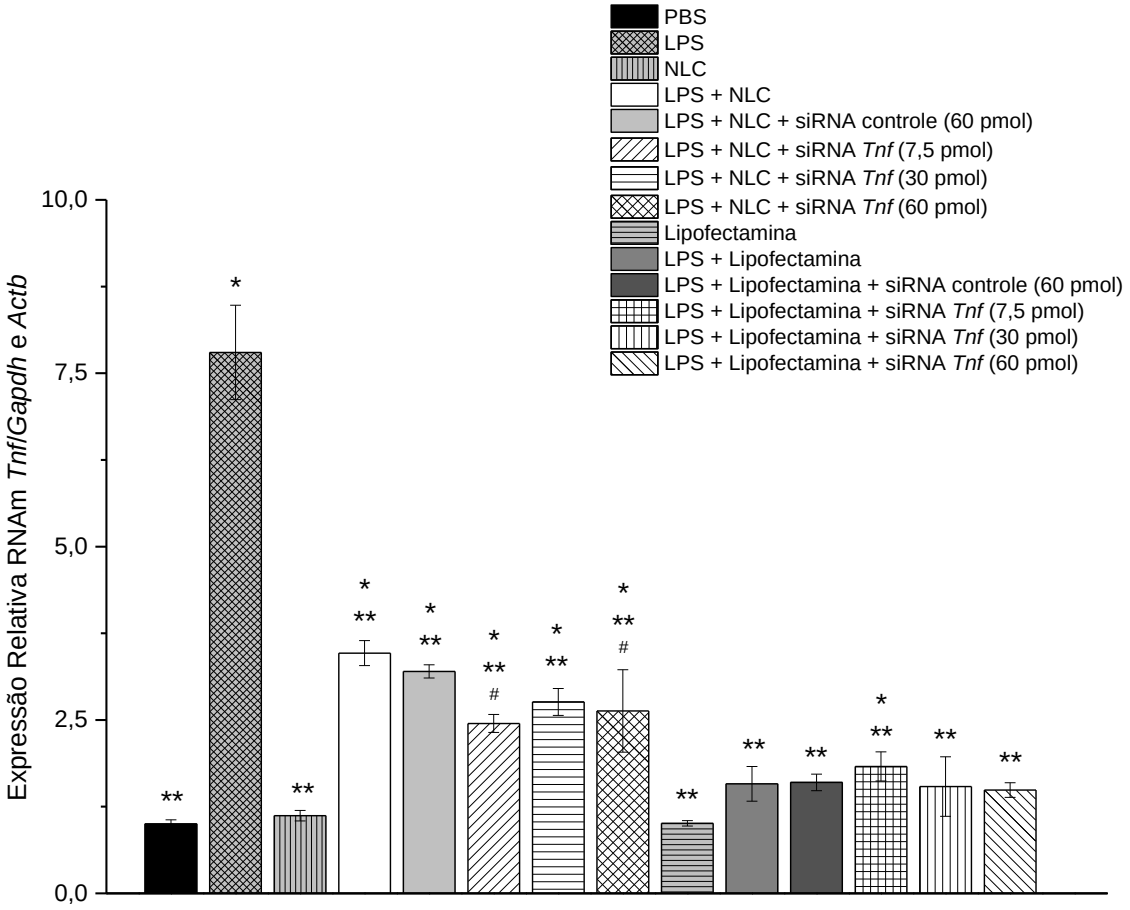


Figura 35 - Níveis do RNAm *Tnf* quantificados por qRT-PCR após o tratamento concomitante dos macrófagos da linhagem J774 por 24 h com LPS e a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) ou Lipofectamina isentas de siRNA e contendo siRNA controle (60 pmol) ou diferentes doses de siRNA *Tnf* (7,5, 30 e 60 pmol). Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo LPS; #p<0,05 em relação ao grupo LPS + NLC.

Pode-se observar novamente que os tratamentos utilizando apenas NLC ou Lipofectamina por 24 h não foram capazes de induzir um processo inflamatório nas células, pois não houve diferença significativa em comparação ao controle PBS. Entretanto, os tratamentos com LPS e com a NLC em associação ao LPS proporcionaram aumento significativo dos níveis do RNAm *Tnf*, em 7,8 e 3,5 vezes, respectivamente. Diferentemente dos resultados obtidos com os tratamentos

concomitantes por 6 h, dentre os tratamentos realizados com Lipofectamina, apenas o tratamento com LPS + Lipofectamina + siRNA *Tnf* (7,5 pmol) foi capaz de aumentar significativamente os níveis do RNAm *Tnf*. Como discutido anteriormente, a Lipofectamina possui interferência na ação do LPS e esse efeito foi mais pronunciado com o aumento do tempo de tratamento para 24 h.

Além disso, pode-se observar que a expressão do RNAm *Tnf* foi mais elevada após sua indução com LPS por 6 h que por 24 h. Estudos reportam que a maior parte do TNF-α secretado pelos macrófagos em resposta ao LPS é resultado do aumento da transcrição do gene *Tnf* e posterior tradução desse RNAm que possui estabilidade na presença de LPS e atinge sua concentração máxima 8 h após o tratamento com LPS por 2 h (RAABE; BUKRINSKY; CURRIE, 1998; BODE; EHLTING; HÄUSSINGER, 2012). Dessa forma, pode-se inferir que as diferenças observadas acima são decorrentes do tempo de tratamento e, que a maior expressão do RNAm *Tnf* após 6 h está de acordo aos resultados obtidos previamente por Raabe e colaboradores (1998). Porém, ao final do tratamento com LPS, em ambos os tempos avaliados, temos um aumento significativo do RNAm *Tnf*, o que garante a aplicabilidade do método *in vitro* proposto para avaliação do silenciamento dessa citocina através da ação de siRNAs.

Neste tratamento proposto, também não houve diferença significativa entre os tratamentos LPS + NLC ou Lipofectamina veiculando siRNA controle comparado ao tratamento LPS + NLC ou Lipofectamina sem siRNA, o que garante a ausência de silenciamento não específico. Também pode-se observar que com o aumento do tempo de tratamento de 6 para 24 h ocorreu a redução significativa dos níveis do RNAm *Tnf* após o tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf* nas doses 7,5 e 60 pmol em 41,1 e 33,7%, respectivamente, comparado ao tratamento com LPS + NLC isenta de siRNA. Os tratamentos com Lipofectamina veiculando diferentes doses de siRNA *Tnf* não foram capazes de reduzir os níveis de RNAm que codificam essa citocina. O aumento do tempo de tratamento para 24 h mostrou-se mais adequado para o silenciamento do RNAm *Tnf*, provavelmente por proporcionar tempo suficiente para captação celular da NLC, escape endossomal e liberação das moléculas de siRNA da NLC, efetiva ligação ao complexo proteico RISC e, consequente degradação do RNAm.

Após os resultados obtidos, como foi observada a interferência da Lipofectamina na ação do LPS em induzir a produção de RNAm *Tnf* em 24 h, foi

proposto um segundo protocolo experimental onde os macrófagos foram pré-tratados com LPS por 2 h para indução da produção de RNAm *Tnf* e, após esse período, tratados com a NLC e controles por 24 h. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 36**.

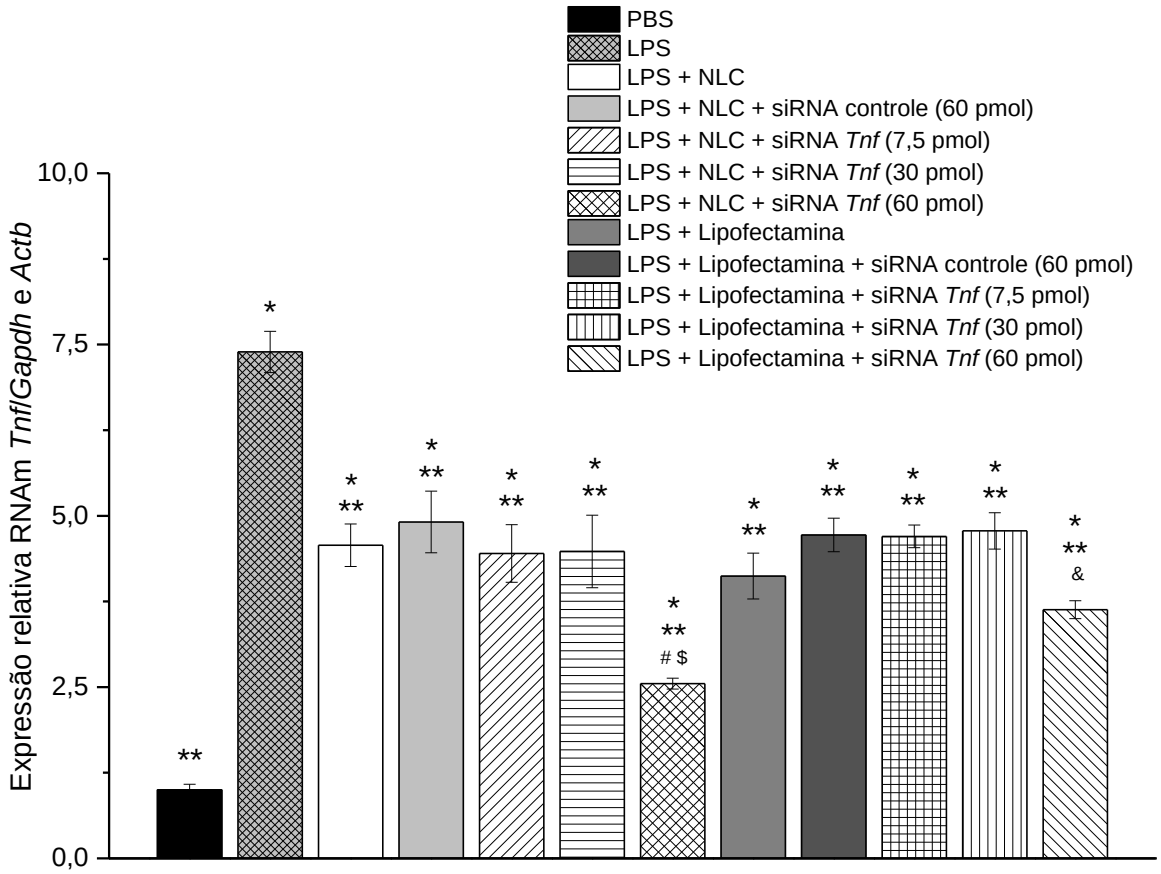


Figura 36 - Níveis do RNAm *Tnf* quantificados por qRT-PCR após o tratamento dos macrófagos da linhagem J774 por 2 h com LPS e 24 h com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) ou Lipofectamina isentas de siRNA e contendo siRNA controle (60 pmol) ou diferentes doses de siRNA *Tnf* (7,5, 30 e 60 pmol). Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo LPS; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo LPS + NLC + siRNA controle (60 pmol); $^{\$}$p<0,05 em relação ao grupo LPS + NLC; $^{\&}$p<0,05 em relação ao grupo LPS + Lipofectamina + siRNA controle (60 pmol).

Pode-se observar, na **Figura 36**, que o pré-tratamento com LPS por 2 h seguido dos tratamentos com a NLC e Lipofectamina por 24 h, aumentaram significativamente os níveis do RNAm *Tnf*. Com este protocolo experimental, a interferência da Lipofectamina na ação do LPS na indução de RNAm *Tnf* foi

resolvida, uma vez que o processo inflamatório já fora iniciado quando os tratamentos foram adicionados.

Novamente não foi observada diferença significativa entre os tratamentos LPS + NLC ou Lipofectamina veiculando siRNA controle comparado ao tratamento LPS + NLC ou Lipofectamina isentas de siRNA o que garante a ausência de silenciamento não específico. O tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf* (60 pmol) foi capaz de reduzir significativamente os níveis do RNAm *Tnf* em 56,6 e 60,4% comparado ao tratamento com a NLC isenta de siRNA e veiculando siRNA controle (60 pmol), respectivamente. Enquanto isso, o tratamento com Lipofectamina veiculando siRNA *Tnf* (60 pmol) reduziu apenas 29,3% os níveis de RNAm *Tnf* em comparação ao tratamento com a Lipofectamina veiculando siRNA controle (60 pmol).

Também foi avaliado o efeito anti-inflamatório da NLC através do pré-tratamento das células com a NLC veiculando siRNA *Tnf* e os controles por 24 h e, em seguida, o estimulo da produção dessa citocina com o tratamento com LPS por 2 h. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 37**.

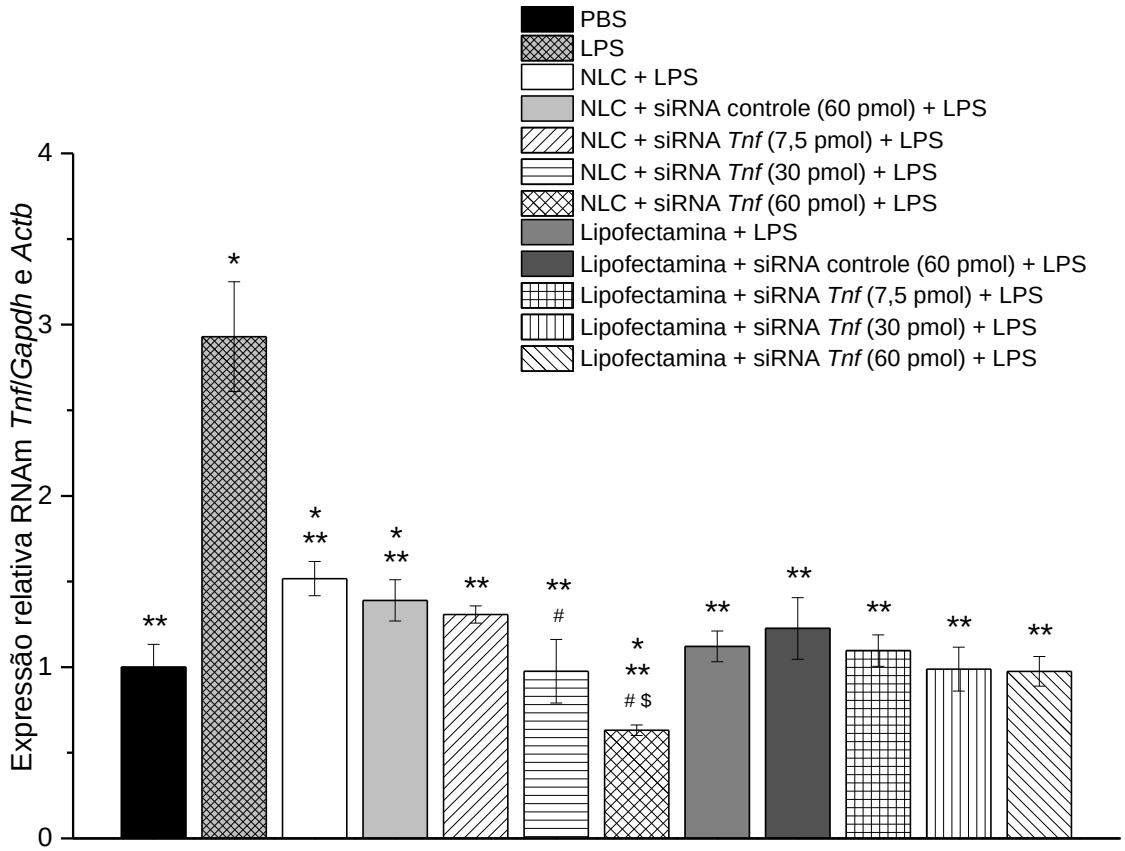


Figura 37 - Níveis do RNAm *Tnf* quantificados por qRT-PCR após o tratamento dos macrófagos da linhagem J774 por 24 h com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) e Lipofectamina isentas de siRNA e contendo siRNA controle (60 pmol) ou diferentes doses de siRNA *Tnf* (7,5, 30 e 60 pmol) seguido do tratamento com LPS por 2 h. Os resultados representam a média de três determinações ± desvio padrão. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo PBS; **p<0,05 em relação ao grupo LPS; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo NLC + LPS; $^{\$}$p<0,05 em relação ao grupo NLC + siRNA controle (60 pmol) + LPS.

Pode-se observar, na **Figura 37**, que os pré-tratamentos por 24 h com a NLC isenta de siRNA e com siRNA controle (60 pmol) seguidos do tratamento com LPS por 2 h, aumentaram significativamente (p<0,05) os níveis do RNAm *Tnf* comparado ao controle PBS em 1,52 e 1,39 vezes, respectivamente. Novamente não foi observada diferença significativa entre os tratamentos LPS + NLC veiculando siRNA controle comparado ao tratamento LPS + NLC isenta de siRNA, o que garante a ausência de silenciamento não específico. O pré-tratamento com a NLC veiculando todas as doses de siRNA *Tnf* avaliadas foi capaz de normalizar os níveis do RNAm *Tnf* induzidos com o tratamento com LPS (sem diferença significativa comparado ao grupo PBS). O pré-tratamento com a NLC veiculando siRNA *Tnf* nas doses de 30 e

60 pmol silenciaram 100% o RNAm *Tnf* induzido pela ação do LPS. O pré-tratamento com a maior dose de siRNA *Tnf* (60 pmol) também foi capaz de silenciar até mesmo os níveis endógenos de RNAm *Tnf* em 40% comparado às células no estado basal, ou seja, sem estímulo com LPS e formulação.

O pré-tratamento com Lipofectamina interferiu novamente na ação do LPS. Como descrito dos resultados de captação celular do siRNA, a Lipofectamina promoveu uma baixa captação celular do siRNA, o que indica que esse reagente de transfecção encontra-se livre no meio de cultivo celular. Dessa forma, interagindo com os receptores de membrana do LPS promovendo seu desacoplamento, o que impede a ação do LPS. Esses resultados condizem com os obtidos nos tratamentos concomitantes da Lipofectamina com LPS, uma vez que, em 24 h, não houve indução significativa da produção de RNAm *Tnf*; com um período menor (2 h), presumia-se um resultado semelhante. Consequentemente, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com Lipofectamina isenta e veiculando siRNA controle ou *Tnf* comparado ao controle PBS.

Os resultados obtidos mostram a aplicabilidade da NLC desenvolvida para a veiculação de siRNA para o silenciamento de citocinas inflamatórias envolvidas em doenças cutâneas.

A literatura relata o uso e a aplicabilidade de modelos *in vitro* para avaliação da eficácia de sistemas carreadores para siRNA assim como para confirmar os resultados de captação celular e liberação de siRNA no citoplasma. Modelos *in vitro* utilizando macrófagos estimulados com LPS são muito utilizados para avaliação do efeito anti-inflamatório de siRNAs específicos para citocinas inflamatórias complexados a nanopartículas (LAROUI et al., 2011; PRÉSUMEY et al., 2012; NEUHAUS et al., 2015). Laroui e colaboradores avaliaram o efeito anti-inflamatório dos complexos de siRNA *Tnf* com PEI ou quitosana incorporados em nanopartículas poliméricas comparado com a Lipofectamina em macrófagos estimulados com LPS. Os macrófagos foram pré-tratados com as formulações por 24 h, seguido do estimulo com LPS por 1 h. Os resultados obtidos mostraram o aumento da produção de TNF-α após sua indução com LPS e, o pré-tratamento com o complexo siRNA *Tnf*/PEI incorporado às nanopartículas reduziram significativamente os níveis dessa citocina. Essa redução não foi obtida com os tratamentos com o complexo siRNA *Tnf*/quitosana e Lipofectamina (LAROUI et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os estudos de Laroui e colaboradores, comprovando a aplicabilidade do modelo *in vitro* de indução de citocinas inflamatórias em macrófagos estimulados com LPS, como também o pré-tratamento com as formulações por 24 h para redução dos níveis dessa citocina, até mesmo sua normalização, o que ressalta a eficácia da NLC desenvolvida. Outro ponto importante a ressaltar é a presença do polímero catiônico PEI em ambos os sistemas, que contribuiu significativamente para a eficácia obtida.

4.8. Avaliação da eficácia do silenciamento do Tnf em modelo in vivo de inflamação aguda após o tratamento com a NLC veiculando siRNA Tnf

A eficácia *in vivo* da NLC foi avaliada pela determinação do efeito do siRNA incorporado neste sistema contra o aumento nos níveis cutâneos de TNF-α em um modelo de inflamação cutânea aguda.

Os resultados, apresentados na **Figura 38,** demonstram que o tratamento com TPA induziu um aumento estatisticamente significativo nos níveis do RNAm que codifica a citocina pró-inflamatória TNF-α na pele dos camundongos, corroborando com outros trabalhos (MURAKAWA et al., 2006; KALYAN KUMAR et al., 2011). No entanto, os pré-tratamentos com a NLC e com a NLC contendo siRNA controle foram capazes de reduzir a indução da produção do RNAm *Tnf* após o tratamento com TPA em 1,8 e 1,5 vezes, respectivamente, provavelmente devido a uma interferência da formulação na ação do TPA, assim como observado *in vitro*. Mesmo com a redução obtida, os níveis do RNAm *Tnf* quantificados após os tratamentos com NCL + TPA e com NLC + siRNA controle + TPA são significativamente maiores que o grupo controle, que não sofreu a ação do TPA, viabilizando o modelo *in vivo* de inflamação aguda para avaliação da eficácia da NLC como sistema carreador para siRNAs. Também pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com a NCL e a NLC contendo siRNA controle, o que mostra a ausência de silenciamento não específico e garante a especificidade do processo de RNAi mediado por siRNA, onde a normalização nos níveis do RNAm *Tnf* ocorre somente quando do uso de um siRNA específico contra a sequência do RNAm que codifica esta citocina.

O pré-tratamento com a NLC contendo siRNA *Tnf* (10 μM) foi capaz de reduzir significativamente os níveis do RNAm *Tnf* em comparação à pele dos

animais expostos ao pré-tratamento com a NLC ou NLC contendo siRNA controle e TPA, nas mesmas doses, em 51,4 e 60,7%, respectivamente.

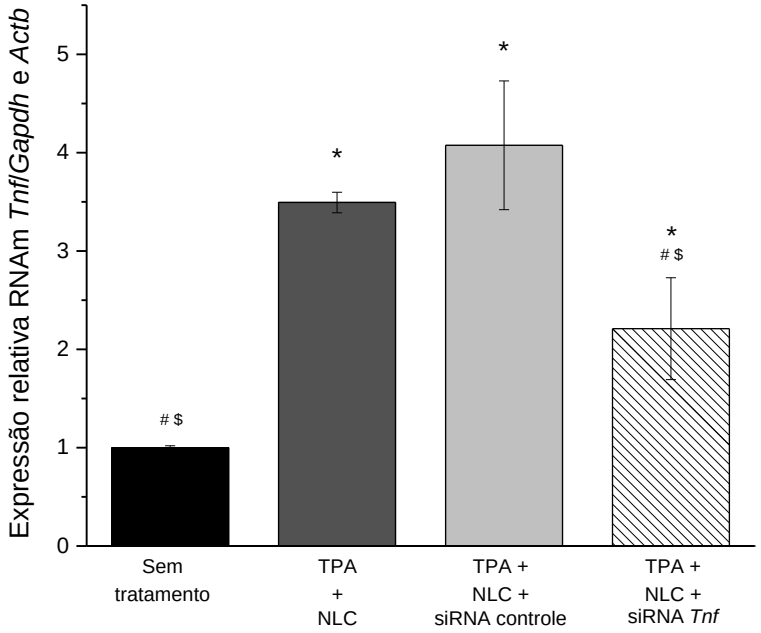


Figura 38 - Efeito da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *Tnf* na normalização do aumento nos níveis do RNAm *Tnf* no modelo *in vivo* de inflamação cutânea aguda induzido por TPA. siRNA na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo sem tratamento; **p<0,05 em relação ao grupo TPA; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo TPA + NLC e, $^{\$}$p<0,05 em relação ao grupo TPA + NLC + siRNA controle.

Estes resultados realçam a importância da NLC desenvolvida para uma entrega eficaz de moléculas de siRNA na pele que, em seguida, são internalizadas pelas células epidérmicas e, no citoplasma, desencadeiam o processo de silenciamento por RNAi.

Após o tratamento tópico com a NLC ter mostrado eficácia no modelo *in vivo* de inflamação cutânea aguda, foi proposto a avaliação da eficácia de um tratamento contínuo em um modelo de psoríase, o qual representa um processo de inflamação crônico.

4.9. Avaliação da eficácia do silenciamento do Tnf em modelo in vivo de psoríase após o tratamento com a NLC veiculando siRNA Tnf

A eficácia *in vivo* da NLC foi avaliada pela determinação do efeito do siRNA incorporado neste sistema contra o aumento nos níveis cutâneos de TNF-α em um modelo de psoríase. O modelo *in vivo* de psoríase utilizado foi baseado no trabalho de van der Fits e colaboradores (2009), que consiste na aplicação tópica diária de imiquimode (65 mg), um potente ativador imunológico, capaz de induzir e exacerbar sinais clínicos semelhantes à psoríase, uma doença inflamatória crônica da pele. A aplicação do imiquimode por 5 dias consecutivos na pele de camundongos Balb/c, induz sinais clínicos inflamatórios semelhantes aos observados nas placas de pele psoriática, tais como rubor, descamação, infiltrado inflamatório neutrofílico, aumento da espessura da epiderme e produção de citocinas pró-inflamatórias (VAN DER FITS et al., 2009).

4.9.1. Avaliação da eficácia do siRNA Tnf veiculado pela NLC por meio da quantificação dos níveis do RNAm Tnf por qRT-PCR

Os resultados apresentados na **Figura 39** demonstram que o tratamento diário com imiquimode por 5 dias consecutivos foi capaz de induzir um aumento estatisticamente significativo nos níveis do RNAm que codifica a citocina pró-inflamatória TNF-α na pele dos camundongos, corroborando com outros trabalhos (VAN DER FITS et al., 2009; BAEK et al., 2012; SUN et al., 2014). Também pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com imiquimode e a NLC isenta de siRNA e veiculando siRNA controle, o que garante a ausência de silenciamento gênico não específico. No entanto, os tratamentos com a NLC veiculando siRNA *Tnf* foram capazes de reduzir significativamente os níveis do RNAm *Tnf* em 88,9 e 91,0% em comparação aos tratamentos com a NLC isenta de siRNA e com a NLC veiculando siRNA controle, respectivamente.

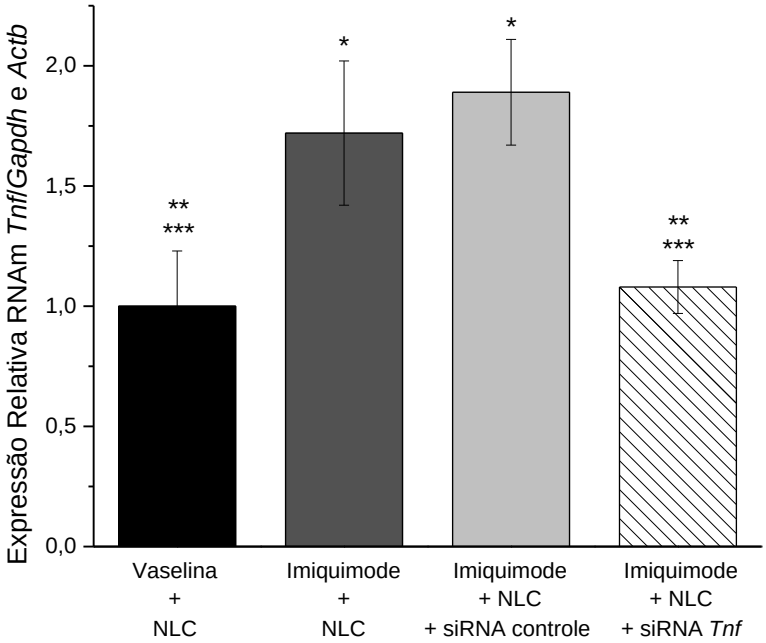


Figura 39 - Efeito da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *Tnf* na normalização do aumento nos níveis do RNAm *Tnf* induzido por imiquimode no modelo *in vivo* de psoríase. siRNA na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo Vaselina + NLC; **p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC; ***p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC + siRNA controle.

Ocorreu um silenciamento expressivo do RNAm *Tnf* após os tratamentos com a NLC veiculando siRNA específico para essa citocina. Esses resultados reforçam a aplicabilidade e efetividade da NLC como sistema de liberação para siRNA em tratamentos cutâneos crônicos, como também, a especificidade do mecanismo de RNAi, uma vez que os níveis do RNAm *Tnf* apenas foram reduzidos com o uso de um siRNA específico.

Considerando as características da NLC desenvolvida e avaliada no presente trabalho, pode-se sugerir que algumas propriedades possam ter sido determinantes para a eficácia da mesma como sistema carreador de siRNA na pele.

A incorporação do polímero catiônico PEI, um dos protótipos utilizados na construção de carreadores do tipo não-viral para terapia gênica, foi importante para eficácia do sistema devido sua alta eficiência em promover a transfecção celular de moléculas de siRNA. O PEI apresenta alta capacidade de se complexar com ácidos

nucléicos por meio de interações eletrostáticas, promovendo a condensação da estrutura dos ácidos nucléicos, reduzindo o seu tamanho e neutralizando sua carga negativa, favorecendo a entrada na célula através da membrana celular (LEE et al., 2010; KREBS; ALSBERG, 2011). Também possui a capacidade de promover o escape endossomal, etapa importante para a liberação das moléculas de siRNA no citoplasma, antes de sua degradação por meio da fusão com os lissosomos, para exercerem sua função de degradação de RNAm específicos (GÜNTHER et al., 2011).

A NLC apresenta propriedades interessantes para ser utilizada como sistema de liberação tópico de siRNAs, por ser um mediador potencial no processo de fusão das membranas, a fase líquido-cristalina pode facilitar a fusão das partículas do sistema com o EC e as camadas mais profundas da pele. A estrutura hexagonal pode ainda melhorar a liberação do fármaco na pele, protegendo-o da degradação física e enzimática e também pode formar um depósito na superfície da pele e seus apêndices, o que resulta em uma liberação prolongada do composto incorporado (LOPES et al., 2006a).

O efeito de aumento da penetração da formulação pode ser relacionado com: (i) presença de promotores de absorção cutânea (MO e AO) na formulação que são capazes de, reversivelmente, alterar a barreira exercida pelo EC, (ii) a organização dos componentes da formulação em uma estrutura líquido-cristalina, uma vez que resultados recentes do nosso grupo demonstraram o efeito mais pronunciado da NLC na promoção da penetração de fármacos na pele, em comparação com uma formulação preparada com os mesmos promotores de absorção, porém, dispersa em polietilenoglicol (LOPES; COLLETT; BENTLEY, 2005; LOPES et al., 2006a, 2006b; LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007; VICENTINI et al., 2013b; ROSSETTI et al., 2016), e (iii) o tamanho nanométrico do sistema, tal como sugerido pela superioridade da NLC em aumentar a penetração cutânea de fármacos em comparação com a fase líquido-cristalina em gel, provavelmente devido a um aumento na área de contato com a pele (LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007) e, outros estudos também demonstraram que nanoestruturas são mais propensas a interagir com o EC e permitir que o siRNA e outros fármacos alcancem as células da epiderme e derme (WU; PRICE; GUY, 2009; GEUSENS et al., 2011; VICENTINI et al., 2013b).

No caso da psoríase, a deterioração da camada do EC também pode ter contribuído para o aumento da penetração cutânea do siRNA e sua influência foi investigada e descrita nas seções seguintes.

4.9.2. Avaliação da eficácia anti-inflamatória do siRNA Tnf veiculado pela NLC pela medida da atividade da mieloperoxidade (MPO)

Além da atividade silenciadora do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC para redução do processo inflamatório na psoríase, também foi avaliado o efeito anti-inflamatório dos tratamentos através da medida da atividade da enzima mieloperoxidade (MPO), uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e de outras células de origem mielóide e que é normalmente usada como um índice de infiltração de granulócitos. A inibição da atividade de MPO é indicativa de atividade anti-inflamatória, e trata-se de uma medida relevante, uma vez que foi demonstrado o aumento nos níveis de estresse oxidativo e a relevância da MPO no modelo *in vivo* de psoríase induzido por imiquimode (BAEK et al., 2012).

Os resultados da dosagem da enzima MPO (**Figura 40**) mostram um aumento significativo na atividade da enzima nos grupos tratados com imiquimode + NLC e imiquimode + NLC veiculando siRNA controle, o que comprova a indução do processo inflamatório pelo imiquimode e a ausência de atividade do siRNA controle. Esses resultados corroboram com estudos prévios, que também descreveram um aumento na atividade da MPO na pele de camundongos tratados com imiquimode (BAEK et al., 2012) e imiquimode associado à formulação isenta de fármaco (SCHMIDT, 2015).

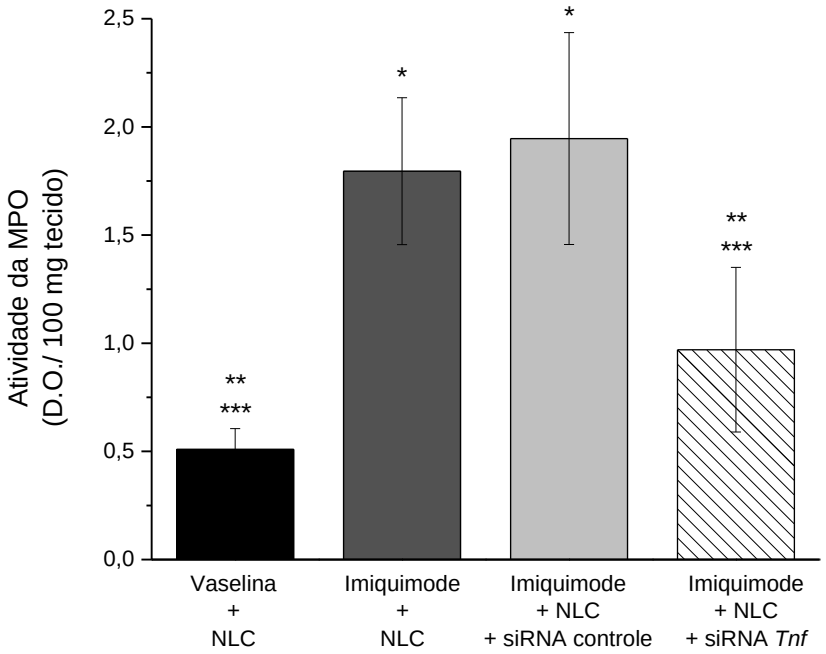


Figura 40 - Medida da atividade da MPO para avaliação do efeito da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) incorporada com siRNA *Tnf* na redução do processo inflamatório induzido por imiquimode no modelo *in vivo* de psoríase. siRNA na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo Vaselina + NLC; **p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC; ***p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC + siRNA controle.

Pode-se observar que o tratamento dos animais com a NLC veiculando siRNA *Tnf* propiciou a redução na atividade da MPO de forma significativa, 64,0 e 67,8% menor que os grupos imiquimode + NLC e imiquimode + NLC + siRNA controle, respectivamente, o que indica uma redução do processo inflamatório na pele dos animais. Estudos mostram que a redução da atividade da MPO pode estar associada a uma redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α (KALYAN KUMAR et al., 2011). Dessa forma, a redução dos níveis do RNAm *Tnf* e da atividade da MPO obtidas após o tratamento tópico com a NLC veiculando siRNA *Tnf* representam resultados relevantes para utilização da NLC como sistema carreador de siRNAs na terapia gênica da psoríase, visto que o aumento dos níveis de TNF-α e o acúmulo de neutrófilos desempenham um papel crucial nas doenças inflamatórias cutâneas e estão relacionados com o mecanismo patológico da doença.

4.9.3. Análises histológicas

O fenótipo característico da psoríase foi observado no dorso dos animais após o tratamento com o imiquimode, como pode-se observar na **Figura 41**, corroborando com outros trabalhos (VAN DER FITS et al., 2009; BAEK et al., 2012). Também pode-se observar uma nítida melhora nesse fenótipo após o tratamento 2x/dia com a NLC veiculando siRNA *Tnf* (**Figura 41D**), apresentando uma redução na descamação e rubor da pele dos animais em comparação aos grupos tratados com imiquimode e a NLC ou NLC + siRNA controle. A neutralização do TNF-α, tal como aplicado em algumas terapias para psoríase, reforça o conceito que essa citocina pró-inflamatória desempenha um papel importante na psoríase, inclusive com ação sobre a proliferação elevada dos queratinócitos (COIMBRA et al., 2012). Dessa forma, pode-se inferir que a redução dos níveis do RNAm *Tnf*, resultado da ação do siRNA *Tnf* veiculado pela NLC, foi substancial para a melhora fenotípica observada no dorso dos animais.

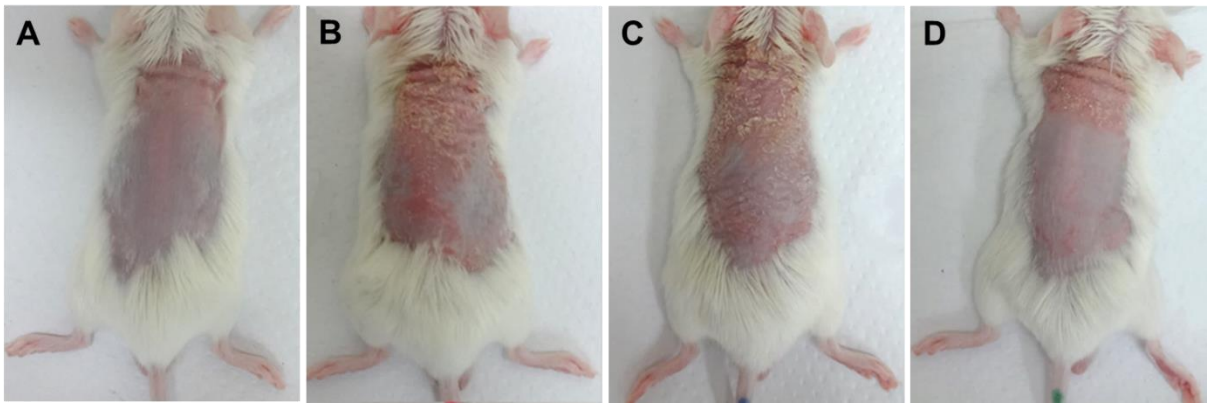


Figura 41 - Imagens representativas da pele de camundongos BALB/c tratadas diariamente com: A) Vaselina + NLC; B) Imiquimode + NLC; C) Imiquimode + NLC + siRNA controle; D) Imiquimode + NLC + siRNA *Tnf* após 5 dias de tratamento. Inflamação cutânea induzida pelo Imiquimode assemelha-se fenotipicamente à psoríase.

A análise das secções das peles corrobora com o fenótipo dos animais, como pode-se observar na **Figura 42**. Os animais que receberam vaselina e foram tratados apenas com o veículo (NLC) não apresentaram alterações na derme e epiderme. A indução da psoríase com imiquimode foi capaz de desenvolver características típicas da psoríase na epiderme, como acantose (hiperplasia da epiderme), hiperceratose (hiperplasia da camada córnea), paraceratose (processo anormal de maturação das células epiteliais, onde ocorre a retenção de núcleos na

camada córnea, caracterizando um processo incompleto de queratinização das células superficiais do epitélio) e alongamento das cristas epiteliais. Também pode-se observar um aumento do número de células inflamatórias na derme, que estão em conformidade com as características histológicas encontradas na psoríase (SUN et al., 2014).

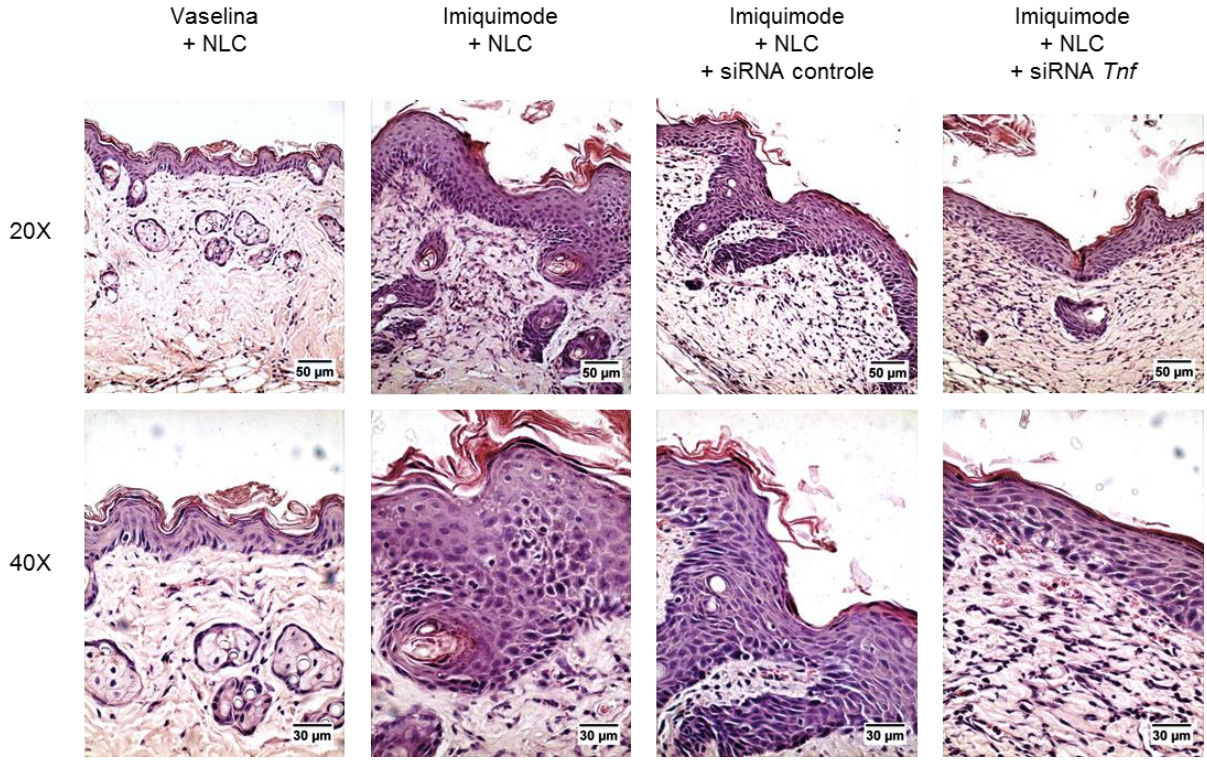


Figura 42 - Fotomicrografias representativas da pele dorsal de camundongos tratados 1x/dia com vaselina ou imiquimode e 2x/dia com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) isenta ou veiculando siRNA controle ou siRNA *Tnf*. siRNA na concentração final de 10 µM. Os cortes foram visualizados por microscopia de luz convencional utilizando a objetiva de 20X e 40X.

Ocorreu um aumento significativo da espessura da epiderme dos animais tratados com imiquimode em relação com grupo de animais tratados com vaselina, como mostra a **Figura 43**. Esse aumento é resultado da proliferação elevada de queratinócitos com diferenciação anormal, devido à ação de várias citocinas e é concordante com outros trabalhos que utilizaram o modelo de psoríase induzida por imiquimode (SUN et al., 2014; KIM; KIM; LEE, 2015). O tratamento com vaselina 1x/dia associado ao tratamento 2x/dia com a NLC não alterou a espessura da epiderme dos animais, uma vez que a espessura média da epiderme de camundongos é de aproximadamente 29 µm (GODIN; TOUITOU, 2007). Entretanto,

o tratamento com imiquimode 1x/dia associado ao tratamento 2x/dia com a NLC veiculando siRNA *Tnf* reduziu significativamente a espessura da epiderme dos animais em 73,0 e 68,8% comparado aos grupos tratados 2x/dia com a NLC e com a NLC veiculando siRNA controle, respectivamente. Não houve diferença significativa na espessura da epiderme entre os grupos tratados 2x/dia com a NLC e NLC veiculando siRNA controle. Como discutido anteriormente, o aumento dos níveis de TNF-α está relacionado a um aumento na proliferação dos queratinócitos (COIMBRA et al., 2012) e a sua redução, além da melhora fenotípica obtida, foi fundamental para redução na espessura da epiderme.

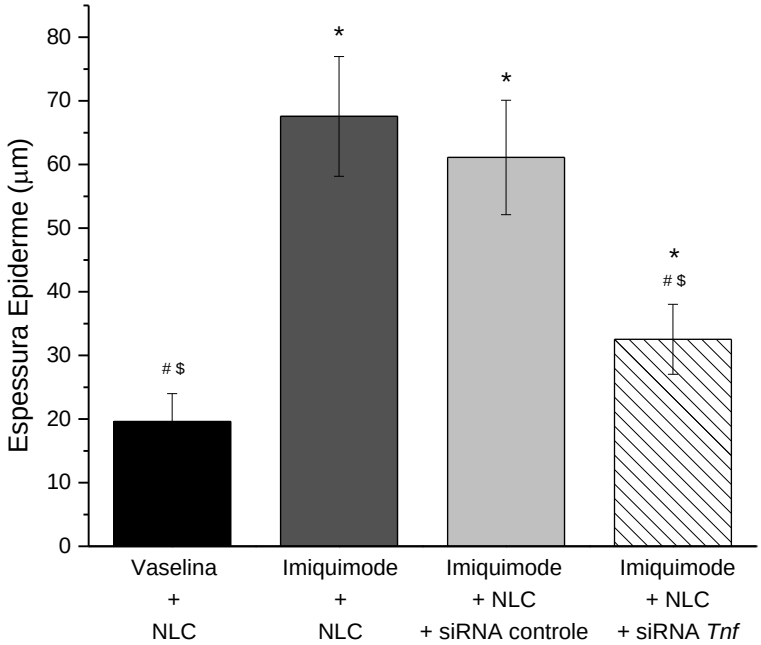


Figura 43 - Espessura da epiderme da pele dorsal de camundongos tratados 1x/dia com vaselina ou imiquimode e 2x/dia com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) isenta ou veiculando siRNA controle ou siRNA *Tnf*. siRNA na concentração final de 10 µM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação ao grupo Vaselina + NLC; $^{\#}$p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC; $^{\$}$p<0,05 em relação ao grupo Imiquimode + NLC + siRNA controle.

4.9.4. Avaliação do efeito do siRNA Tnf veiculado pela NLC no PASI

O índice da área e severidade da psoríase (PASI) é considerado o sistema de pontuação para avaliação clínica da psoríase mais estudado e validado por médicos e pesquisadores. Também é considerado essencial para avaliação do prognóstico

da doença e é aceito como padrão ouro na clínica médica. O PASI é determinado pela avaliação da área da pele afetada e por três sintomas: rubor, descamação e espessura da lesão psoriática (SHRIVASTAVA et al., 2015).

O tratamento tópico com imiquimode, 1x/dia, durante 5 dias consecutivos, foi capaz de aumentar significativamente e, de forma tempo-dependente, os escores da psoríase, tais como o rubor cutâneo, descamação e acantose (representada pela espessura da orelha). Após 2 ou 3 dias do início da aplicação do imiquimode, a pele do dorso dos camundongos começou a mostrar sinais de eritema, descamação e espessamento (**Figura 44**). Enquanto isso, os animais tratados diariamente com a formulação controle, vaselina, não mostraram qualquer sinal de inflamação.

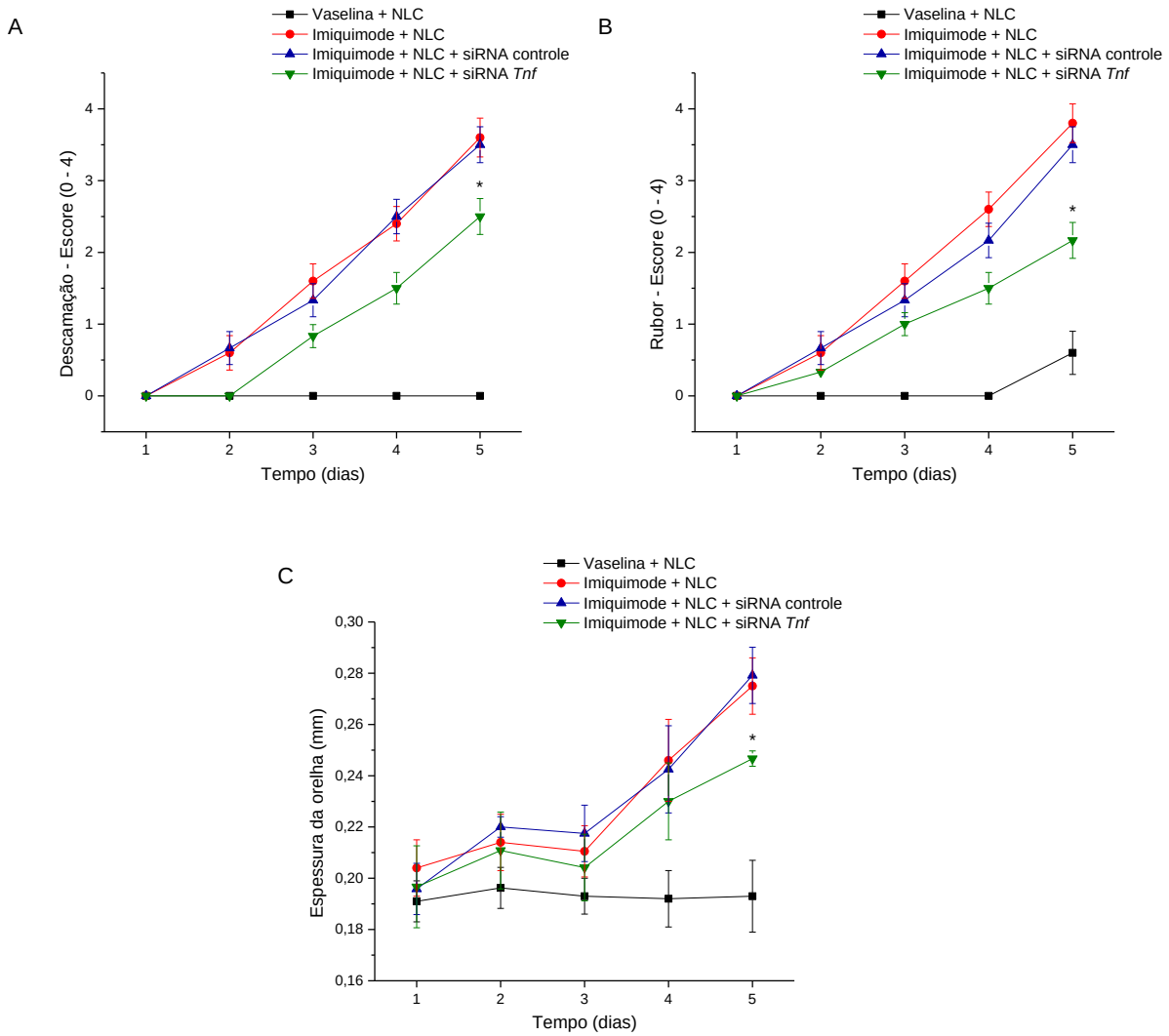


Figura 44 - Evolução temporal da [A] descamação, [B] rubor e [C] espessura da orelha dos animais tratados com Vaselina + NLC, Imiquimode + NLC, Imiquimode + NLC + siRNA controle e Imiquimode + NLC + siRNA *Tnf*. siRNA na concentração final de 10 µM. Os símbolos indicam a pontuação média (0 – 4) ou média da espessura da orelha ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada com os dados obtidos no último dia do experimento pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *p<0,05 em relação aos grupos Vaselina + NLC, Imiquimode + NLC e Imiquimode + NLC + siRNA controle.

No último dia de avaliação dos animais, pode-se observar uma redução significativa dos escores do grupo tratado 2x/dia com a NLC veiculando siRNA *Tnf* em comparação aos grupos tratados com imiquimode em associação ao tratamento 2x/dia com a NLC ou a NLC veiculando siRNA controle. Não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com a NLC e a NCL veiculando siRNA controle. Novamente, a redução da produção de TNF-α, resultante da ação do siRNA veiculando pela NLC, apresentou resultados positivos, que evidenciam a

aplicabilidade da terapia gênica com o uso de siRNAs e do uso da NLC como sistema de liberação tópico para o tratamento da psoríase.

4.9.5. Avaliação do efeito do siRNA Tnf veiculado sobre o comportamento de prurido espontâneo

Um dos principais sintomas relatados por pacientes com psoríase é o prurido intenso, que acomete cerca de 2/3 dos pacientes, e pode ser definido como uma percepção incômoda na pele, que desencadeia a necessidade de se coçar. A coceira acentuada pode afetar seriamente a qualidade de vida dos pacientes, podendo também apresentar implicações psicológocas graves (PRIGNANO et al., 2009).

De acordo com a **Figura 45**, a indução da psoríase experimental em camundongos, através do tratamento 1x/dia com imiquimode, promoveu, de maneira significativa, um comportamento de prurido espontâneo em comparação ao grupo de animais controle (tratados com vaselina 1x/dia) no último dia do protocolo experimental. Contudo, o comportamento de prurido foi reduzido de forma significativa no grupo dos animais tratados com a NLC contendo siRNA *Tnf*. Não foi observada diferença no comportamento de prurido entre os animais dos grupos tratado com a NLC e a NCL contendo siRNA controle.

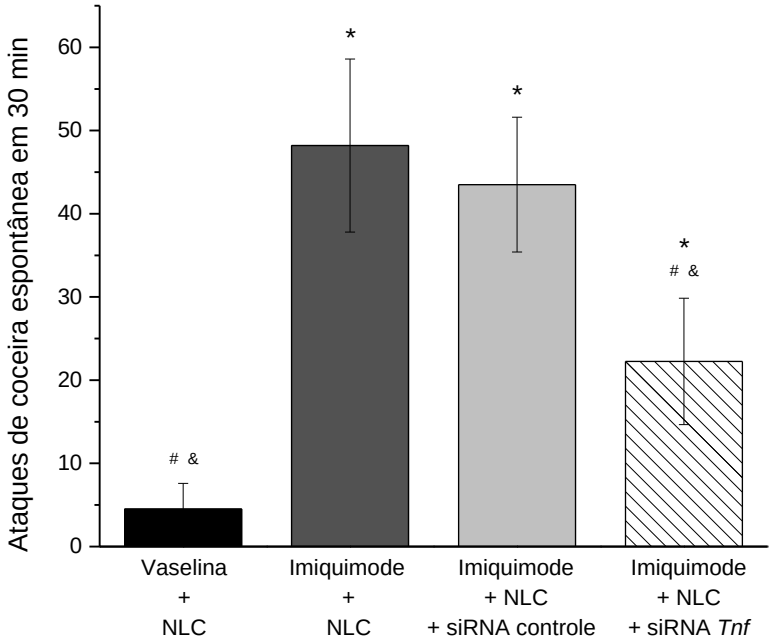


Figura 45 - Efeito da administração tópica (1x/dia) de vaselina ou imiquimode associado aos tratamentos (2x/dia) com a NLC isenta de siRNA e veiculando siRNA controle ou siRNA *Tnf* sobre os ataques de coceira espontânea em camundongos. siRNA na concentração final de 10 μM. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, *$p<0,05$ em relação ao grupo Vaselina + NLC; $^{\#}p<0,05$ em relação ao grupo Imiquimode + NLC; $^{\&}p<0,05$ em relação ao grupo Imiquimode + NLC + siRNA controle.

Vários estudos mostram que os principais mediadores e mecanismos envolvidos na coceira incluem a histamina, neuropeptídios, eicosanoides, citocinas (IL-1, IFN-γ, TNF-α), dentre outros (NAKAMURA; TOYODA; MOROHASHI, 2003). Embora os níveis de TNF-α estejam associados aos mediadores relacionados à coceira, nenhum estudo foi realizado, até o momento, para relacionar diretamente sua redução com a redução na deflagração do prurido agudo cutâneo na psoríase. Dessa forma, os resultados obtidos, mostrando o efeito da redução dos níveis do RNAm que codificam essa citocina na redução dos ataques de coceira nos animais psoriáticos induzidos com imiquimode, sugerem evidências da participação do TNF-α na modulação do prurido em pacientes com psoríase, porém necessita ser melhor investigada.

A administração tópica de dexametasona veiculada por uma dispersão líquido-cristalina 2x/dia em animais psoriáticos induzidos por imiquimode resultou em

uma redução significativa do número de ataques de coceira (SCHMIDT, 2015). A dexametasona é um glicocorticóide com ação anti-inflamatória capaz de reduzir os níveis de TNF-α (BOS; SPULS, 2008). Indiretamente, os resultados de Schmidt (2015) reforçam a suposição da influência do TNF-α no prurido encontrado na psoríase induzida por imiquimode.

4.10. Avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLC em modelo in vivo de psoríase por microscopia confocal de varreadura a laser

O estudo da penetração de fármacos após a aplicação de produtos tópicos geralmente é avaliado com o uso de pele normal ou intacta. No entanto, os produtos tópicos muitas vezes são aplicados na pele doente e é bem conhecido que a pele pode ser funcionalmente e estruturalmente alterada pela psoríase (LIN et al., 2015). Estudos prévios do grupo, demostraram o potencial da NLC em promover a penetração cutânea do siRNA *in vitro*, utilizando pele de orelha suína como modelo de pele e, *in vivo*, utilizando camundongos sem pelo, ambos os modelos utilizando pele sadia e intacta (DEPIERI, 2012; VICENTINI et al., 2013b; PETRILLI et al., 2016). Dessa forma, foi proposta a avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLC na pele psoriática induzida pela aplicação tópica de imiquimode. Em consequência da autofluorescência da pele, devido à presença de compostos endógenos como as proteínas estruturais melanina, queratina, colágeno, dentre outros, que emitem fluorescência num comprimento de onda na faixa de 400 – 450 nm (DEPIERI et al., 2015), foi utilizado um siRNA controle marcado com Alexa-647, que apresenta um espectro de excitação/emissão diferente, com a finalidade de evitar possíveis interferências da autofluorescência da pele.

Pode-se observar que o tratamento com imiquimode associado ao tratamento com a NLC veiculando siRNA controle não apresentou nenhuma interferência na fluorescência (**Figura 46**). Também pode-se observar que a NLC foi capaz de promover a penetração cutânea do siRNA no modelo *in vivo* de psoríase e, essas moléculas alcançaram as camadas mais profundas da pele.

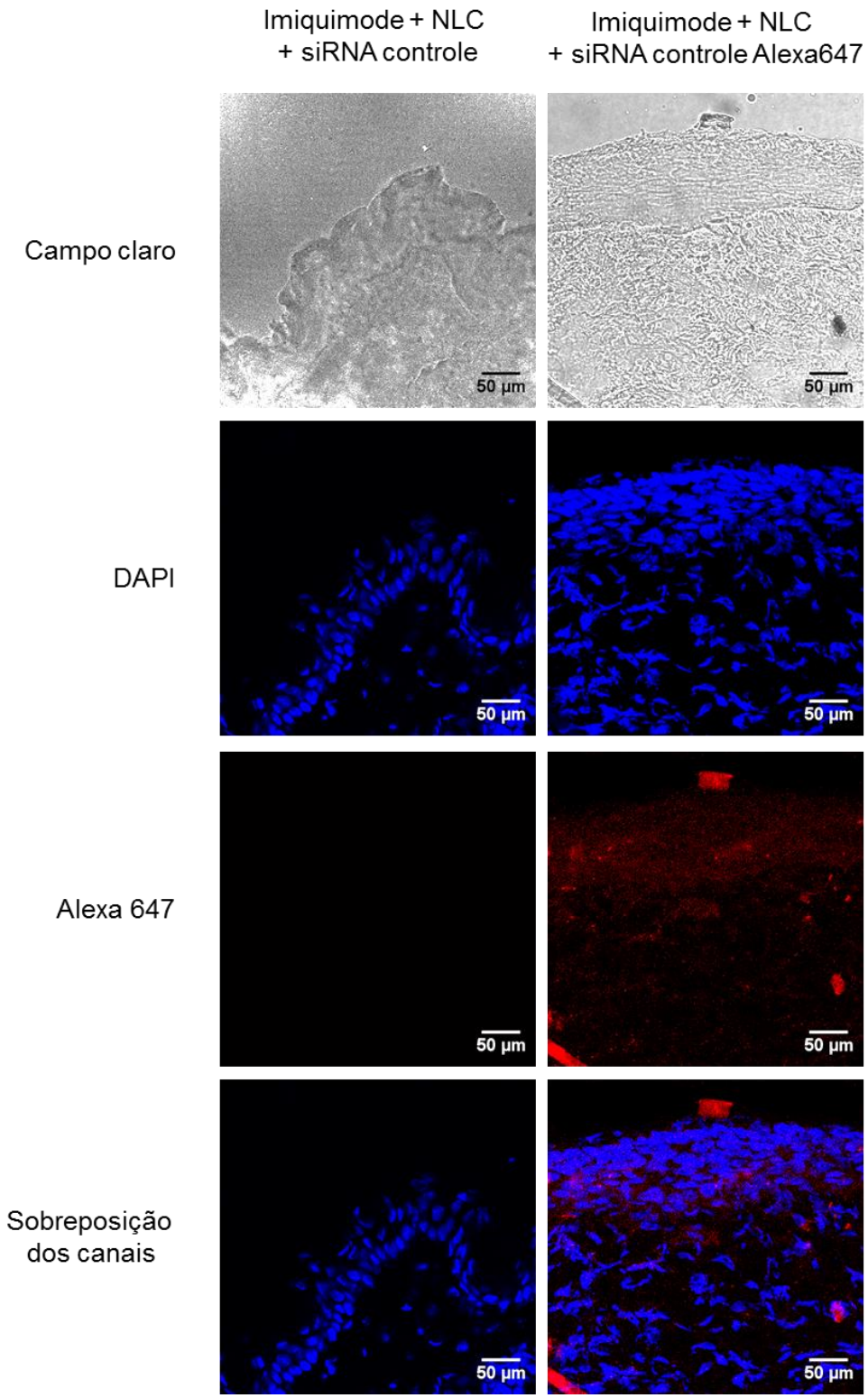


Figura 46 - Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de secções de pele tratadas com imiquimode 1x/dia associado com o tratamento com a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) veiculando siRNA controle ou siRNA controle-Alexa 647. As imagens representam a sobreposição máxima de secções ópticas *xy* em função da profundidade (*z*). Os cortes foram corados com DAPI para visualização do núcleo (azul). Lasers: UV (405 nm), emissão: 420 – 516 nm (azul); Visível (638 nm), emissão: 647 – 743 nm (vermelho). Objetiva 63X, barra: 50 µm.

O comprometimento da função barreira da pele é descrito para a psoríase (RAYCHAUDHURI; MAVERAKIS; RAYCHAUDHURI, 2014; LIN et al., 2015). A deterioração da barreira exercida pelo EC favoreceu a entrega do siRNA para a pele, por outro lado, o aumento da espessura da epiderme, devido à queratinização anormal na psoríase, que cria um caminho mais longo através do qual os fármacos têm de se difundir (FANG et al., 2008), não influenciou na penetração do siRNA, que encontra-se distribuído por toda a epiderme atingindo também as camadas da derme.

Os resultados obtidos corroboram com os estudos de Lin e colaboradores (2015), que avaliaram o perfil de penetração cutânea de 4 fármacos empregados no tratamento da psoríase, utilizando o modelo *in vivo* de psoríase induzida por imiquimode. Seus resultados demostraram que a penetração cutânea dos fármacos estudados foi maior na pele psoriática que na pele sadia. Verificaram ainda que a função barreira danificada, e não o aumento da espessura da epiderme, exerce influência de forma favorável na penetração dos fármacos através da pele psoriática, principalmente dos fármacos hidrofílicos, os quais tiveram uma elevada absorção percutânea (LIN et al., 2015).

O aumento da penetração cutânea do siRNA observado no presente estudo é explicado pelas características histológicas alteradas na pele psoriática, que favorecem a penetração do siRNA e pelas características da NLC, discutidas anteriormente, como o tamanho das partículas, a sua composição e a estrutura líquido-cristalina.

Conclusões

5. Conclusões

Face aos resultados obtidos pode-se concluir que:

• A dispersão dos sistemas líquido-cristalinos, compostos por MO:FA ou MO:AO:FA e incorporados com os adjuvantes catiônicos PEI e OAM, utilizando o processo de sonicação foi adequado e produziu partículas de tamanho nanométrico (~ 200 nm), índice de polidispersão abaixo de 0,3 para as formulações preparadas com PEI e abaixo de 0,4 para as preparadas com OAM e com um residual de carga positivo. A adição de siRNA às NLCs não alterou os parâmetros avaliados.

• As NLCs preparadas com o polímero catiônico PEI foram eficazes em promover uma elevada captação das moléculas de siRNA em linhagem celular de fibroblastos e a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) mostrou-se a mais adequada para tal objetivo, sendo escolhida para os estudos seguintes.

• A NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) foi capaz de complexar o siRNA na concentração final de 10 μM, protege-lo por 24 h da degradação enzimática e libera-lo de forma intacta, etapas importantes no processo de RNAi e que foram alcançadas pela NLC.

• A aplicação tópica na NLC em epiderme humana reconstruída por 2, 5 e 12 h pode ser considerada segura para a pele. Sua aplicação simulando um tratamento prolongado também pode ser considerada bem tolerada pela pele, pois manteve a viabilidade dos tecidos acima de 50% e os níveis liberados de IL-1α ficaram no limite dos estabelecidos para uma curta aplicação, uma vez que não há parâmetros estabelecidos para classificação de substâncias como irritante e não irritante após um tratamento prolongado.

• A aplicação tópica da NLC foi eficaz em promover a liberação funcional do siRNA *IL6*, que reduziu eficientemente os níveis de IL-6 em modelo de pele humana reconstruída psoriática em aproximadamente 70% após um único tratamento por 6 h. Também foi eficaz em reduzir os níveis dessa citocina e do RNAm que a codifica em aproximadamente 35 e 50%, respectivamente, após o tratamento por 3 dias consecutivos.

• A NLC também foi eficaz em promover uma elevada captação das moléculas de siRNA em linhagem celular de macrófagos.

• A aplicação da NLC como sistema de liberação foi eficaz em promover a liberação funcional do siRNA *Tnf*, que reduziu significativamente os níveis do RNAm *Tnf* nos macrófagos em 40 e 60% após o tratamento concomitante com LPS por 24 h e no

tratamento por 24 h após o estímulo prévio com LPS, respectivamente. A eficácia foi ainda maior com o pré-tratamento por 24 h seguido do estímulo com LPS, que normalizou os níveis do RNAm *Tnf* e, com a maior dose de siRNA avaliada, houve a redução dos níveis endógenos desse RNAm em 40%.

• A aplicação tópica da NLC veiculando siRNA *Tnf* no modelo *in vivo* de inflamação cutânea aguda induzida por TPA foi eficaz em promover a redução significativa dos níveis do RNAm *Tnf*, em comparação a pele dos animais expostos ao pré-tratamento com a NLC ou NLC contendo siRNA controle e TPA, nas mesmas doses, em 51,4 e 60,7%, respectivamente.

• A aplicação tópica da NLC veiculando siRNA *Tnf* no modelo *in vivo* de psoríase induzida por imiquimode foi eficaz na redução dos níveis do RNAm *Tnf* (~ 90%), da atividade da mieloperoxidade (~ 65%) e da espessura da epiderme (~ 70%) em comparação à pele dos animais expostos aos tratamentos com a NLC ou NLC contendo siRNA controle. Também foi eficaz na melhora fenotípica dos animais, com redução do rubor, descamação, acantose e na redução do número de ataques de coceira, resultantes da redução do processo inflamatório obtido pela ação efetiva das moléculas de siRNA *Tnf*.

• A aplicação tópica da NLC foi eficaz em promover a penetração cutânea das moléculas de siRNA nas camadas mais profundas da pele psoriática.

Dessa forma, pode-se concluir que a NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) é um sistema de liberação tópico promissor para a liberação funcional de siRNAs para o tratamento de doenças cutâneas, uma vez que foi capaz de superar as barreiras da administração tópica e, também foi capaz de complexar, proteger contra a degradação enzimática e promover a captação celular das moléculas de siRNA e, no citoplasma, escapar do tráfego endossomal e liberar as moléculas de siRNA intactas que, eficientemente, silenciaram seu alvo específico através da degradação do RNAm pelo processo de interferência por RNA.

Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

AGRAWAL, Y.; PETKAR, K. C.; SAWANT, K. K. Development, evaluation and clinical studies of Acitretin loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 401, n. 1-2, p. 93–102, 2010.

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

AKINC, A.; ZUMBUEHL, A.; GOLDBERG, M.; LESHCHINER, E. S.; BUSINI, V.; HOSSAIN, N.; BACALLADO, S. A.; NGUYEN, D. N.; ALVAREZ, R.; BORODOVSKY, A.; BORLAND, T.; CONSTIEN, R.; FOUGEROLLES, D.; DORKIN, J. R.; JAYAPRAKASH, K. N.; JOHN, M.; KOTELIANSKY, V.; MANOHARAN, M.; QIN, J.; RACIE, T.; RAITCHEVA, D.; RAJEEV, K. G.; SAH, D. W. Y.; SOUTSCHEK, J.; TOUDJARSKA, I.; VORNLOCHER, H.; ZIMMERMANN, T. S.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. **Nature Biotechnological**, v. 26, n. 5, p. 561–569, 2008.

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

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

AMAR-YULI, I.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Solubilization of food bioactives within lyotropic liquid crystalline mesophases. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 1, p. 21–32, 2009.

AMAR-YULI, I.; WACHTEL, E.; SHOSHAN, E. Ben; DANINO, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Hexosome and hexagonal phases mediated by hydration and polymeric stabilizer. **Langmuir**, v. 23, n. 7, p. 3637–3645, 2007.

BAEK, J. O.; BYAMBA, D.; WU, W. H.; KIM, T. G.; LEE, M. G. Assessment of an imiquimod-induced psoriatic mouse model in relation to oxidative stress. **Archives of Dermatological Research**, v. 304, n. 9, p. 699–706, 2012.

BAGLEY, D. M.; GARDNER, J. R.; HOLLAND, G.; LEWIS, R. W.; VRIJHOF, H.; WALKER, a. P. Eye irritation: Updated reference chemicals data bank. **Toxicology *in Vitro***, v. 13, p. 505–510, 1999.

BAK, R. O.; MIKKELSEN, J. G. Regulation of cytokines by small RNAs during skin inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, p. 53, 2010.

BELOQUI, A.; COCO, R.; ALHOUAYEK, M.; SOLINÍS, M. Á.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; MUCCIOLI, G. G.; PRÉAT, V. Budesonide-loaded nanostructured lipid carriers reduce inflammation in murine DSS-induced colitis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 2, p. 775–783, 2013.

BENFER, M.; KISSEL, T. Cellular uptake mechanism and knockdown activity of siRNA-loaded biodegradable DEAPA-PVA-g-PLGA nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 247–256, 2012.

BERTH-JONES, J. Psoriasis. **Medicine**, v. 41, n. 6, p. 334–340, 2013.

BODE, J. G.; EHLTING, C.; HÄUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38 MAPK-STAT3 axis. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1185–1194, 2012.

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

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

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

BORNÉ, J.; NYLANDER, T.; KHAN, A. Microscopy, SAXD, and NMR studies of phase behavior of the monoolein-diolein-water system. **Langmuir**, v. 16, n. 22, p. 10044–10054, 2000.

BOS, J. D.; SPULS, P. I. Topical treatments in psoriasis: today and tomorrow. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 5, p. 432–437, 2008.

BRACKE, S.; DESMET, E.; GUERRERO-ASPIZUA, S.; TJABRINGA, S. G.; SCHALKWIJK, J.; VAN GELE, M.; CARRETERO, M.; LAMBERT, J. Identifying targets for topical RNAi therapeutics in psoriasis: Assessment of a new *in vitro* psoriasis model. **Archives of Dermatological Research**, v. 305, n. 6, p. 501–512, 2013.

BRUNNER, T.; COHEN, S.; MONSONEGO, A. Silencing of proinflammatory genes targeted to peritoneal-residing macrophages using siRNA encapsulated in biodegradable microspheres. **Biomaterials**, v. 31, n. 9, p. 2627–2636, 2010.

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

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

CHANG, D. P.; BARAUSKAS, J.; DABKOWSKA, A. P.; WADSÄTER, M.; TIBERG, F.; NYLANDER, T. Non-lamellar lipid liquid crystalline structures at interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 222, p. 135–147, 2015.

CHEN, Y.; MA, P.; GUI, S. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

CHI, C. C.; WANG, S. H. Efficacy and cost-efficacy of biologic therapies for moderate to severe psoriasis: A meta-analysis and cost-efficacy analysis using the intention-to-treat principle. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

CHONG, J. Y. T.; MULET, X.; WADDINGTON, L. J.; BOYD, B. J.; DRUMMOND, C. J. Steric stabilisation of self-assembled cubic lyotropic liquid crystalline nanoparticles: high throughput evaluation of triblock polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide copolymers. **Soft Matter**, v. 7, n. 10, p. 4768, 2011.

CLINICAL TRIALS.GOV. Clinical trials with siRNA. Disponivel em <http://www.clinicaltrials.gov>. Acesso em fevereiro, 2016.

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

COSTA, S. K. P.; STARR, A.; HYSLOP, S.; GILMORE, D.; BRAIN, S. D. How important are NK1 receptors for influencing microvascular inflammation and itch in the skin? Studies using *Phoneutria nigriventer* venom. **Vascular Pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 209–214, 2006.

Cubic Phase Particles in Drug Delivery. **Particle Science Drug Delively Service**, v. 4, 2012.

DAI, Q.; PRUETT, S. B. Ethanol suppresses LPS-induced toll-like receptor 4 clustering, reorganization of the actin cytoskeleton, and associated TNF-α production. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, n. 8, p. 1436–1444, 2006.

DAKA, A.; PEER, D. RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 13, p. 1508–1521, 2012.

DE FOUGEROLLES, A. R. Delivery vehicles for small interfering RNA *in vivo*. **Human Gene Therapy**, v. 19, n. 2, p. 125–32, 2008.

DE FOUGEROLLES, A.; VORNLOCHER, H.-P.; MARAGANORE, J.; LIEBERMAN, J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 6, n. 6, p. 443–453, 2007.

DE PAULA, D.; BENTLEY, M. V. L. B.; MAHATO, R. I. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. **RNA**, v. 13, p. 431–456, 2007.

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

DEPIERI, L. V. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos para veiculação de siRNA na terapia gênica**, 2012. 91 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

DEPIERI, L. V.; GARCIA PRAÇA, F. S.; CAMPOS, P. M.; BENTLEY, M. V. L. B. Advances in the bioanalytical study of drug delivery across the skin. **Therapeutic Delivery**, v. 6, p. 173–196, 2015.

DESAI, P. R.; MAREPALLY, S.; PATEL, A. R.; VOSHAVAR, C.; CHAUDHURI, A.; SINGH, M. Topical delivery of anti-TNFα siRNA and capsaicin via novel lipid-polymer hybrid nanoparticles efficiently inhibits skin inflammation *in vivo*. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 1, p. 51–63, 2013.

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

DONG, Y.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1-2, p. 101–111, 2011.

DOUGLAS, K. L.; PICCIRILLO, C. A.; TABRIZIAN, M. Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 676–687, 2008.

ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultures mammalian cells. **Nature**, v. 411, p. 494–498, 2001.

FALLER, C.; BRACHER, M.; DAMI, N.; ROGUET, R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. **Toxicology *in Vitro***, v. 16, p. 557–572, 2002.

FANG, J. Y.; FANG, C. L.; LIU, C. H.; SU, Y. H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 633–640, 2008.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FLATEN, G. E.; PALAC, Z.; ENGESLAND, A.; FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J.; VANIĆ, Ž.; ŠKALKO-BASNET, N. *In vitro* skin models as a tool in optimization of drug formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p. 10–24, 2015.

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

FONG, C.; LE, T.; DRUMMOND, C. J. Lyotropic liquid crystal engineering-ordered nanostructured small molecule amphiphile self-assembly materials by design. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 3, p. 1297–322, 2012.

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

GANEM-QUINTANAR, A; QUINTANAR-GUERRERO, D.; BURI, P. Monoolein: a review of the pharmaceutical applications. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 8, p. 809–820, 2000.

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

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

GEUSENS, B.; LAMBERT, J.; DE SMEDT, S. C.; BUYENS, K.; SANDERS, N. N.; VAN GELE, M. Ultradeformable cationic liposomes for delivery of small interfering RNA (siRNA) into human primary melanocytes. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 3, p. 214–220, 2009.

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

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1152–1161, 2007.

GOODING, M.; BROWNE, L. P.; QUINTEIRO, F. M.; SELWOOD, D. L. siRNA Delivery: From Lipids to Cell-penetrating Peptides and Their Mimics. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 80, n. 6, p. 787–809, 2012.

GROEBER, F.; HOLEITER, M.; HAMPEL, M.; HINDERER, S.; SCHENKE-LAYLAND, K. Skin tissue engineering - *In vivo* and *in vitro* applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4-5, p. 352–366, 2011.

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

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R. J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23-24, p. 1032–1040, 2010a.

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

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 611–620, 1995.

HARTUNG, T. Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation. **European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing**, v. 1, p. 1–7, 2007.

HICKERSON, R. P.; SMITH, F. J. D.; REEVES, R. E.; CONTAG, C. H.; LEAKE, D.; LEACHMAN, S. a; MILSTONE, L. M.; MCLEAN, W. H. I.; KASPAR, R. L. Single-nucleotide-specific siRNA targeting in a dominant-negative skin model. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 594–605, 2008.

HONG, C. A.; NAM, Y. S. Functional nanostructures for effective delivery of small interfering RNA therapeutics. **Theranostics**, v. 4, n. 12, p. 1211–1232, 2014.

HOSMER, J. M.; STEINER, A. A.; LOPES, L. B. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of paclitaxel: Impact of the monoglyceride. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 694–706, 2013.

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

JAKOBSEN, M.; STENDERUP, K.; ROSADA, C.; MOLDT, B.; KAMP, S.; DAM, T. N.; JENSEN, T. G.; MIKKELSEN, J. G. Amelioration of Psoriasis by Anti-TNF-α RNAi in the Xenograft Transplantation Model. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 10, p. 1743–1753, 2009.

JOO, M. K.; YHEE, J. Y.; KIM, S. H.; KIM, K. The potential and advances in RNAi therapy: Chemical and structural modifications of siRNA molecules and use of biocompatible nanocarriers. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 113–121, 2014.

KALYAN KUMAR, G.; DHAMOTHARAN, R.; KULKARNI, N. M.; MAHAT, M. Y. A.; GUNASEKARAN, J.; ASHFAQUE, M. Embelin reduces cutaneous TNF-α level and ameliorates skin edema in acute and chronic model of skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 662, n. 1-3, p. 63–69, 2011.

KANASTY, R. L.; WHITEHEAD, K. A.; VEGAS, A. J.; ANDERSON, D. G. Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 3, p. 513–24, 2012.

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

KESHARWANI, P.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N. K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. **Biomaterials**, v. 33, n. 29, p. 7138–7150, 2012.

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

KIM, C.-H.; KIM, J.-Y.; LEE, A.-Y. Therapeutic and immunomodulatory effects of glucosamine in combination with low-dose cyclosporine A in A murine model of imiquimod-induced psoriasis. **European Journal of Pharmacology**, v. 756, p. 43–51, 2015.

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

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

KWOK, A.; HART, S. L. Comparative structural and functional studies of nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 2, p. 210–219, 2011.

LAROUI, H.; THEISS, A. L.; YAN, Y.; DALMASSO, G.; NGUYEN, H. T. T.; SITARAMAN, S. V.; MERLIN, D. Functional TNF-α gene silencing mediated by polyethyleneimine/TNF-α siRNA nanocomplexes in inflamed colon. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 1218–1228, 2011.

LEACHMAN, S. A; HICKERSON, R. P.; SCHWARTZ, M. E.; BULLOUGH, E. E.; HUTCHERSON, S. L.; BOUCHER, K. M.; HANSEN, C. D.; ELIASON, M. J.; SRIVATSA, G. S.; KORNBRUST, D. J.; SMITH, F. J.; MCLEAN, W. I.; MILSTONE, L. M.; KASPAR, R. L. First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder. **Molecular Therapy** , v. 18, n. 2, p. 442–446, 2010.

LEAL, C.; BOUXSEIN, N. F.; EWERT, K. K.; SAFINYA, C. R. Highly Efficient Gene Silencing Activity of siRNA Embedded in a Nanostructured Gyroid Cubic Lipid Matrix. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 47, p. 16841–16847, 2010.

LEE, S. Y.; HUH, M. S.; LEE, S.; LEE, S. J.; CHUNG, H.; PARK, J. H.; OH, Y. K.; CHOI, K.; KIM, K.; KWON, I. C. Stability and cellular uptake of polymerized siRNA (poly-siRNA)/polyethylenimine (PEI) complexes for efficient gene silencing. **Journal of Controlled Release**, v. 141, p. 339–346, 2010.

LEON-PONTE, M.; KIRCHHOF, M. G.; SUN, T.; STEPHENS, T.; SINGH, B.; SANDHU, S.; MADRENAS, J. Polycationic lipids inhibit the pro-inflammatory response to LPS. **Immunology Letters**, v. 96, n. 1, p. 73–83, 2005.

LI, K.; ARMSTRONG, A. W. A Review of Health Outcomes in Patients with Psoriasis. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n. 1, p. 61–72, 2012.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 356, n. 2, p. 375–386, 2011.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; YARIV, D.; SHOHAM, G.; GARTI, N. Concentration- and temperature-induced effects of incorporated desmopressin on the properties of reverse hexagonal mesophase. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 18, p. 6336–6346, 2009.

LIMA, E. A.; LIMA, M. A. Imunopatogênese da psoríase: Revisando conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1151–1158, 2011.

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

LOPES, L. B.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. V. L. B. Topical delivery of cyclosporin A: An *in vitro* study using monoolein as a penetration enhancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 25–30, 2005.

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

LOPES, L. B.; LOPES, J. L. C.; OLIVEIRA, D. C. R.; THOMAZINI, J. A.; GARCIA, M. T. J.; FANTINI, M. C. A.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: Characterization and study of *in vitro* and *in vivo* delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 146–155, 2006b.

LOPES, L. B.; SPERETTA, F. F. F.; BENTLEY, M. V. L. B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 209–215, 2007.

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

LU, Z. X.; LIU, L. T.; QI, X. R. Development of small interfering RNA delivery system using PEI-PEG-APRPG polymer for antiangiogenic vascular endothelial growth factor tumor-targeted therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1661–1673, 2011.

LV, H.; ZHANG, S.; WANG, B.; CUI, S.; YAN, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p.100-109, 2006. .

MAREPALLY, S.; BOAKYE, C. H.; 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**, v. 9, n. 14, p. 2157–2174, 2014.

MARTIMPREY, H.; VAUTHIER, C.; MALVY, C.; COUVREUR, P. Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 490–504, 2009.

MARTÍNEZ, T.; JIMÉNEZ, A. I.; PAÑEDA, C. SHORT-INTERFERENCE RNAS : BECOMING MEDICINES. **EXCLI Journal**, v. 14, p. 714–746, 2015.

MATHES, S. H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin models in drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69-70, p. 81–102, 2014.

MatTek Corporation. Disponível em <http://www.mattek.com>. Acesso em: janeiro, 2016.

MILAK, S.; ZIMMER, A. Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 569–587, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

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

NAKAMURA, M.; TOYODA, M.; MOROHASHI, M. Pruritogenic mediators in psoriasis vulgaris: Comparative evaluation of itch-associated cutaneous factors. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 4, p. 718–730, 2003.

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

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

NEUHAUS, B.; FREDE, A.; WESTENDORF, A. M.; EPPLE, M. Gene silencing of the pro-inflammatory cytokine TNF-α with siRNA delivered by calcium phosphate nanoparticles, quantified by different methods. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 36, p. 7186–7193, 2015.

NGUYEN, T. H. **Investigation of novel liquid crystalline materials for the sustained oral delivery of poorly water soluble drugs**. 2008. 290 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - Monash Institute of Pharmaceutical Sciences, Monash University, Melbourne, 2008.

NICKOLOFF, B. J. Cracking the cytokine code in psoriasis. **Nature Medicine**, v. 13, n. 3, p. 242–244, 2007.

NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. The RNAi revolution. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 161–164, 2004.

OLIVEIRA, A. C. N.; MARTENS, T. F.; RAEMDONCK, K.; ADATI, R. D.; FEITOSA, E.; BOTELHO, C.; GOMES, A. C.; BRAECKMANS, K.; REAL OLIVEIRA, M. E. C. D. Dioctadecyldimethylammonium: Monoolein Nanocarriers for Efficient *in Vitro* Gene Silencing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 9, p. 6977–6989, 2014.

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

PAN, X.; HAN, K.; PENG, X.; YANG, Z.; QIN, L.; ZHU, C.; HUANG, X.; SHI, X.; DIAN, L.; LU, M.; WU, C. Nanostructured cubosomes as advanced drug delivery system. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 35, p. 6290–7, 2013.

PARK, Y. H.; JEONG, S. H.; YI, S. M.; CHOI, B. H.; KIM, Y. R.; KIM, I. K.; KIM, M. K.; SON, S. W. Analysis for the potential of polystyrene and TiO_2 nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization. **Toxicology *in Vitro***, v. 25, n. 8, p. 1863–1869, 2011.

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

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

PEI, Y.; YEO, Y. Drug delivery to macrophages: Challenges and opportunities. **Journal of Controlled Release**, in press, 2015.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; PRAÇA, F. S. G.; CIAMPO, J. O. Del; FANTINI, M. A. C.; FONSECA, M. J. V; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid Crystalline Nanodispersions Functionalized with Cell-Penetrating Peptides for Topical Delivery of Short-Interfering RNAs : A Proposal for Silencing a Pro-Inflammatory Cytokine in Cutaneous Diseases. **Journal of Biomedical Nanotechnology,** v. 12, p. 1–13, 2016.

PETRILLI, R.; PRAÇA, F. S. G.; CAROLLO, A. R. H.; MEDINA, W. S. G.; OLIVEIRA, K. T.; FANTINI, M. C. A; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S.; SERRA, O. A; IAMAMOTO, Y.; BENTLEY, M. V. L. B. Nanoparticles of Lyotropic Liquid Crystals : A Novel Strategy for the Topical Delivery of a Chlorin Derivative for Photodynamic Therapy of Skin Cancer. **Current Nanoscience,** v. 9, p. 434–441, 2013.

PHAN, S.; FONG, W. K.; KIRBY, N.; HANLEY, T.; BOYD, B. J. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, n. 1, p. 176–182, 2011.

PINTO, M. F.; MOURA, C. C.; NUNES, C.; SEGUNDO, M. A.; COSTA LIMA, S. A.; REIS, S. A new topical formulation for psoriasis: Development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1-2, p. 519–526, 2014.

PRAÇA, F. S. G.; MEDINA, W. S. G.; PETRILLI, R.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid Crystal Nanodispersions Enable the Cutaneous Delivery of Photosensitizer for Topical PDT: Fluorescence Microscopy Study of Skin Penetration. **Current Nanoscience**, v. 8, p. 535–540, 2012.

PRADHAN, M.; SINGH, D.; SINGH, M. R. Novel colloidal carriers for psoriasis: Current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches. **Journal of Controlled Release**, v. 170, n. 3, p. 380–395, 2013.

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

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

PRÉSUMEY, J.; SALZANO, G.; COURTIES, G.; SHIRES, M.; PONCHEL, F.; JORGENSEN, C.; APPARAILLY, F.; DE ROSA, G. PLGA microspheres encapsulating siRNA anti-TNFalpha: Efficient RNAi-mediated treatment of arthritic joints. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 3, p. 457–464, 2012.

PRIGNANO, F.; RICCERI, F.; PESCITELLI, L.; LOTTI, T. Itch in psoriasis: epidemiology, clinical aspects and treatment options. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 2, p. 9–13, 2009.

RAABE, T.; BUKRINSKY, M.; CURRIE, R. A. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 2, p. 974–980, 1998.

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

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

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

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

ROSSETTI, F. C.; FANTINI, M. C. A.; CAROLLO, A. R. H.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M. V. L. B. Analysis of liquid crystalline nanoparticles by small angle X-ray diffraction: Evaluation of drug and pharmaceutical additives influence on the internal structure. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 2849–2857, 2011.

RUPONEN, M.; RÖNKKÖ, S.; HONKAKOSKI, P.; PELKONEN, J.; TAMMI, M.; URTTI, A. Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33875–33880, 2001.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 182–195, 2010.

SCHMIDT, T. P. **Avaliação farmacológica de uma nanodispersão contendo GYY4137 (doador de liberação lenta de H2S) na psoríase experimental**. 2015. Dissertação (mestrado em farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SCHÖN, M. P.; BOEHNCKE, W.-H. Psoriasis. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 18, p. 1899–1912, 2005.

SEMLIN, L.; SCHÄFER-KORTING, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C. *In vitro* models for human skin disease. **Drug Discovery Today**, v. 16, p. 132–139, 2011.

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

SHEN, Y.; WANG, B.; LU, Y.; OUAHAB, A.; LI, Q.; TU, J. A novel tumor-targeted delivery system with hydrophobized hyaluronic acid-spermine conjugates (HHSCs) for efficient receptor-mediated siRNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, n. 1-2, p. 233–243, 2011.

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

SIEKMANN, B.; BUNJES, H.; KOCH, M. H. J.; WESTESEN, K. Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride – water phases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1, p. 33–43, 2002.

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

SINGH, A.; TALEKAR, M.; RAIKAR, A.; AMIJI, M. Macrophage-targeted delivery systems for nucleic acid therapy of inflammatory diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 515–530, 2014.

SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reports**, v. 324, n. 2-4, p. 107–269, 2000.

SUN, J.; DOU, W.; ZHAO, Y.; HU, J. A comparison of the effects of topical treatment of calcipotriol, camptothecin, clobetasol and tazarotene on an imiquimod-induced psoriasis-like mouse model. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 36, n. 1, p. 17–24, 2014.

THANIK, V. D.; GREIVES, M. R.; LERMAN, O. Z.; SEISER, N.; DEC, W.; CHANG, C. C.; WARREN, S. M.; LEVINE, J. P.; SAADEH, P. B. Topical matrix-based siRNA silences local gene expression in a murine wound model. **Gene Therapy**, v. 14, p. 1305–1308, 2007.

TRAN, M. A.; GOWDA, R.; SHARMA, A.; PARK, E. J.; ADAIR, J.; KESTER, M.; SMITH, N. B.; ROBERTSON, G. P. Targeting V600EB-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. **Cancer Research**, v. 68, n. 18, p. 7638–7649, 2008.

VADER, P.; VAN DER AA, L. J.; ENGBERSEN, J. F. J.; STORM, G.; SCHIFFELERS, R. M. A method for quantifying cellular uptake of fluorescently labeled siRNA. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 1, p. 106–109, 2010.

VAN DER FITS, L.; MOURITS, S.; VOERMAN, J. S. a; KANT, M.; BOON, L.; LAMAN, J. D.; CORNELISSEN, F.; MUS, A.-M.; FLORENCIA, E.; PRENS, E. P.; LUBBERTS, E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 5836–5845, 2009.

VAN DER KROL, A. R.; MUR, L. A.; BELD, M.; MOL, J. N. M.; STUITJE, A. R. Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. **The Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 291–299, 1990.

VERMA, I. M.; WEITZMAN, M. D. GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 711–738, 2005.

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

VICENTINI, F. T. M. C.; DEPIERI, L. V.; POLIZELLO, A. C. M.; CIAMPO, J. O. Del; SPADARO, A. C. C.; FANTINI, M. C. A; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 16–24, 2013b.

WANG, J.; LU, Z.; WIENTJES, M. G.; AU, J. L.-S. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 4, p. 492–503, 2010.

WANG, M.; ALBERTI, K.; VARONE, A.; POULI, D.; GEORGAKOUDI, I.; XU, Q. Enhanced intracellular siRNA delivery using bioreducible lipid-like nanoparticles. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 9, p. 1398–1403, 2014.

WELSS, T.; BASKETTER, D. A.; SCHRÖDER, K. R. *In vitro* skin irritation: Facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicology *in Vitro***, v. 18, n. 3, p. 231–243, 2004.

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

WÖRLE, G.; DRECHSLER, M.; KOCH, M. H. J.; SIEKMANN, B.; WESTESEN, K.; BUNJES, H. Influence of composition and preparation parameters on the properties of aqueous monoolein dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 150–157, 2007.

WU, S. Y.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; CALIN, G. A.; SOOD, A. K. RNAi Therapies: Drugging the Undruggable. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 240, p. 240–247, 2014.

WU, X.; PRICE, G. J.; GUY, R. H. Disposition of nanoparticles and an associated lipophilic permeant following topical application to the skin. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1441–1448, 2009.

YAGHMUR, A.; GLATTER, O. Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 333–342, 2009.

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

ZABARA, A.; MEZZENGA, R. Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases. **Journal of Controlled Release**, v. 188, p. 31–43, 2014.

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

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

ZHEN, G.; HINTON, T. M.; MUIR, B. W.; SHI, S.; TIZARD, M.; MCLEAN, K. M.; HARTLEY, P. G.; GUNATILLAKE, P. Glycerol monooleate-based nanocarriers for siRNA delivery *in vitro*. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 9, p. 2450–2457, 2012.

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