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

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

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.

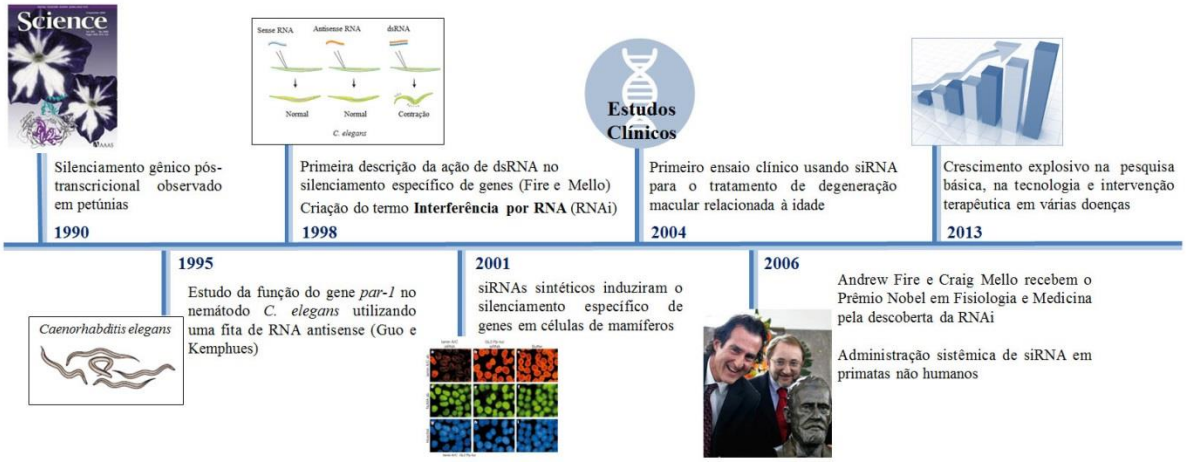

Figura 1 - Cronologia do desenvolvimento e aplicações da Interferência por RNA.

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).

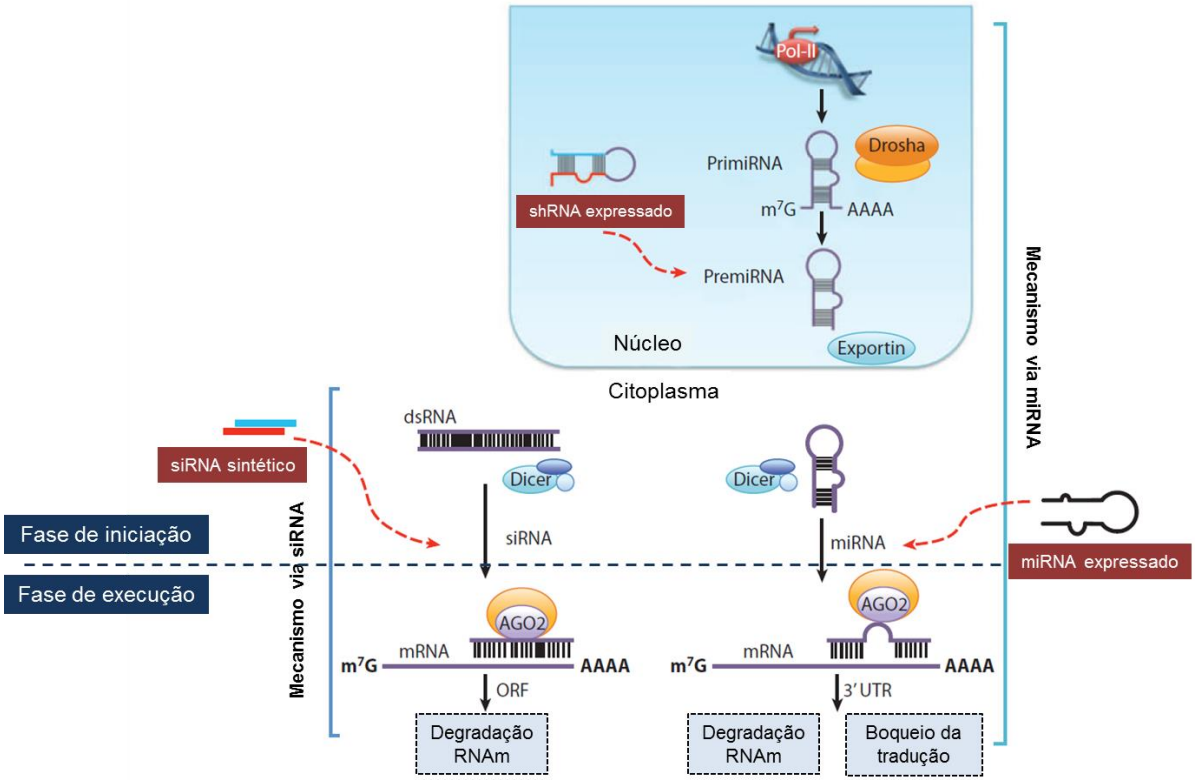

Figura 2 - Mecanismo de interferência por RNA. Adaptado de (HUANG; LIU, 2011).

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).

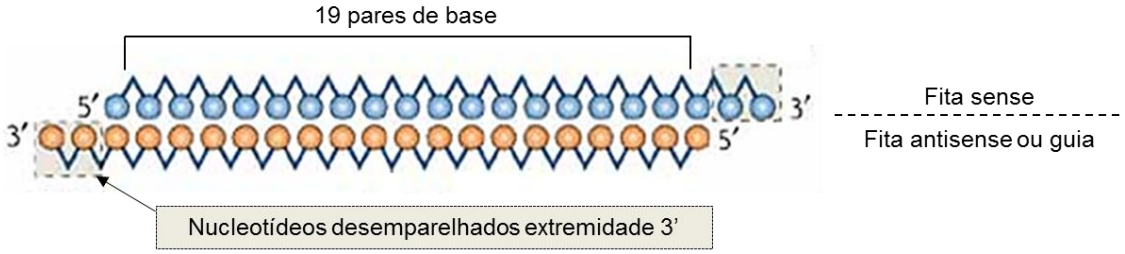

Figura 3 - Estrutura da molécula de siRNA. Adaptado de (DE FOUGEROLLES et al., 2007).

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).

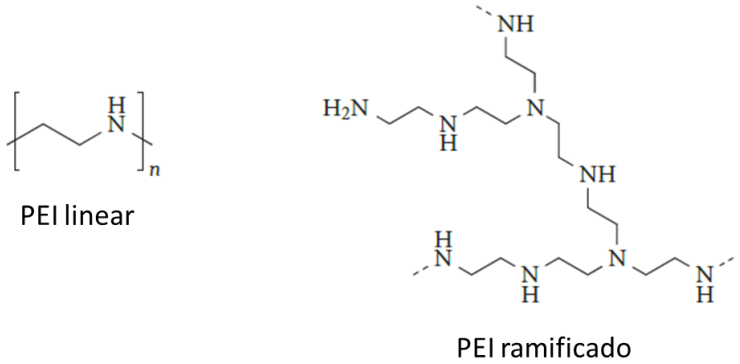

Figura 4 - Estrutura molecular do polímero catiônico PEI (YIN et al., 2014).

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).

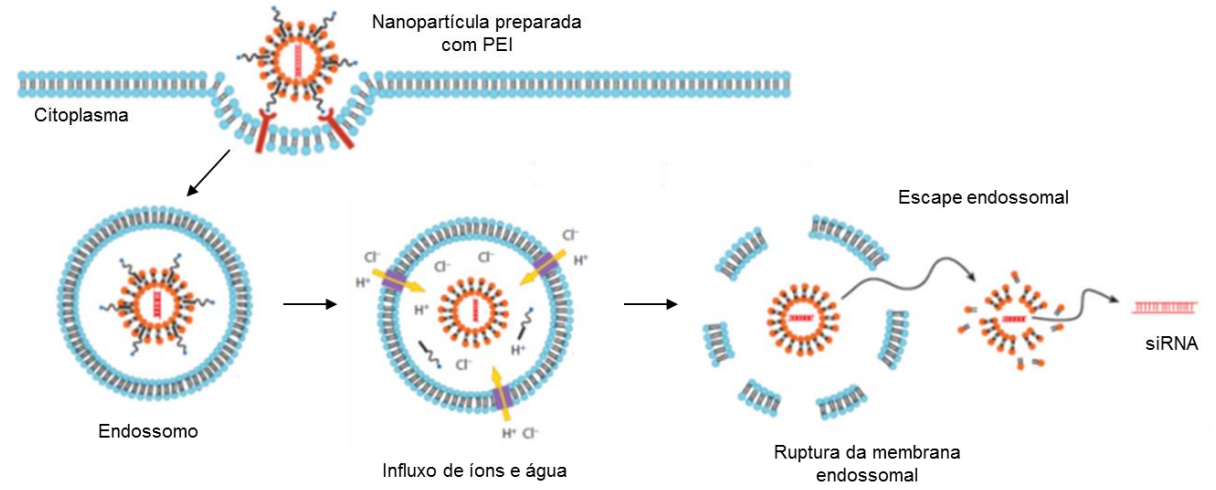

Figura 5 - Esquematização do mecanismo de escape endossomal de nanopartículas preparadas com PEI, conhecido como “efeito esponja de prótons”. Adaptado de (HUANG; LIU, 2011).

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).

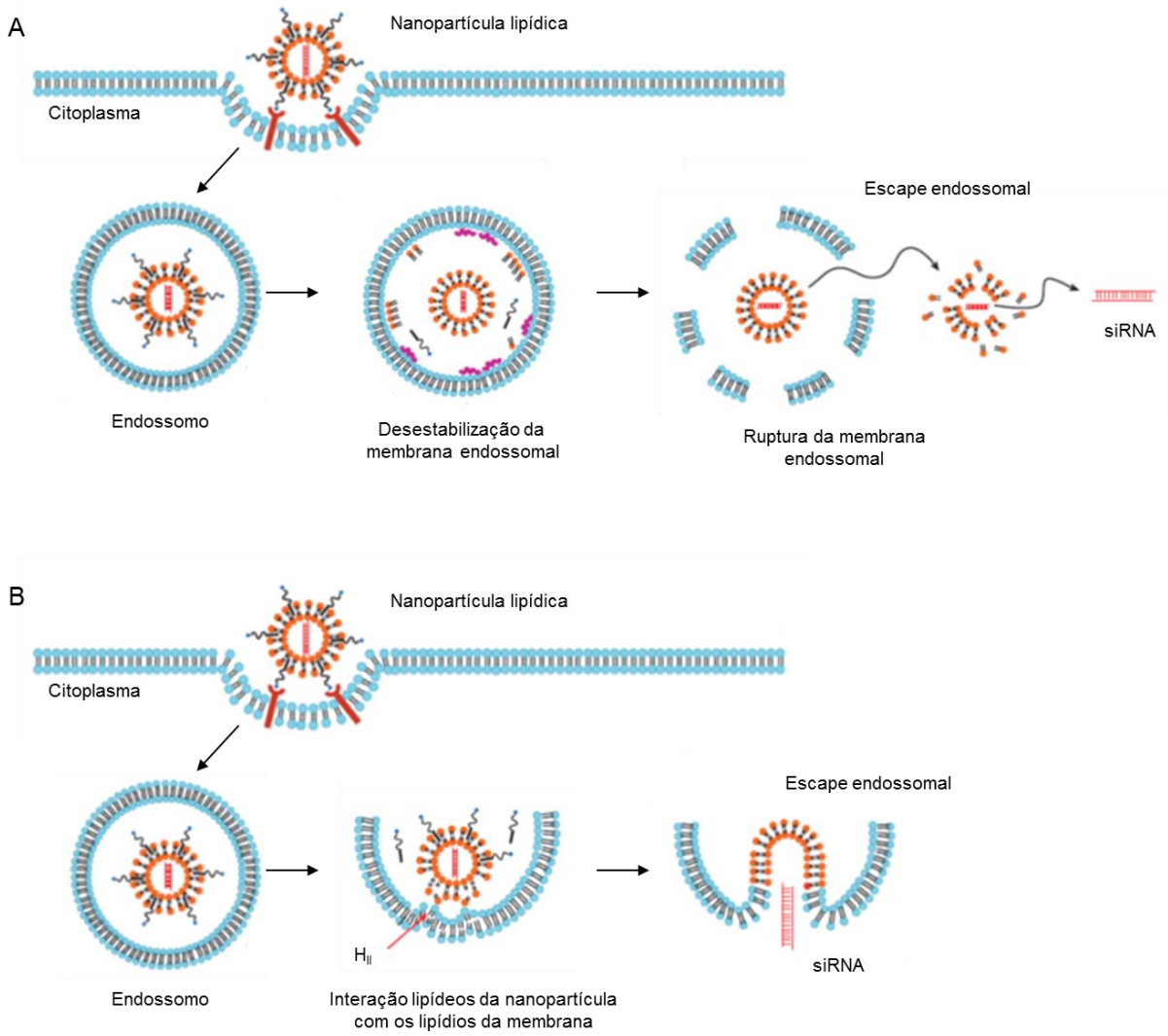

Figura 6 - Esquematização do mecanismo de escape endossomal de nanopartículas lipídicas por [A] desestabilização da membrana endossomal e por [B] formação de fase hexagonal. Adaptado de (HUANG; LIU, 2011).

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).

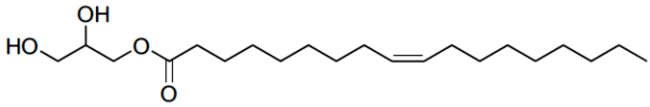

Figura 7 - Estrutura molecular da monoleína (PAN et al., 2013).

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).

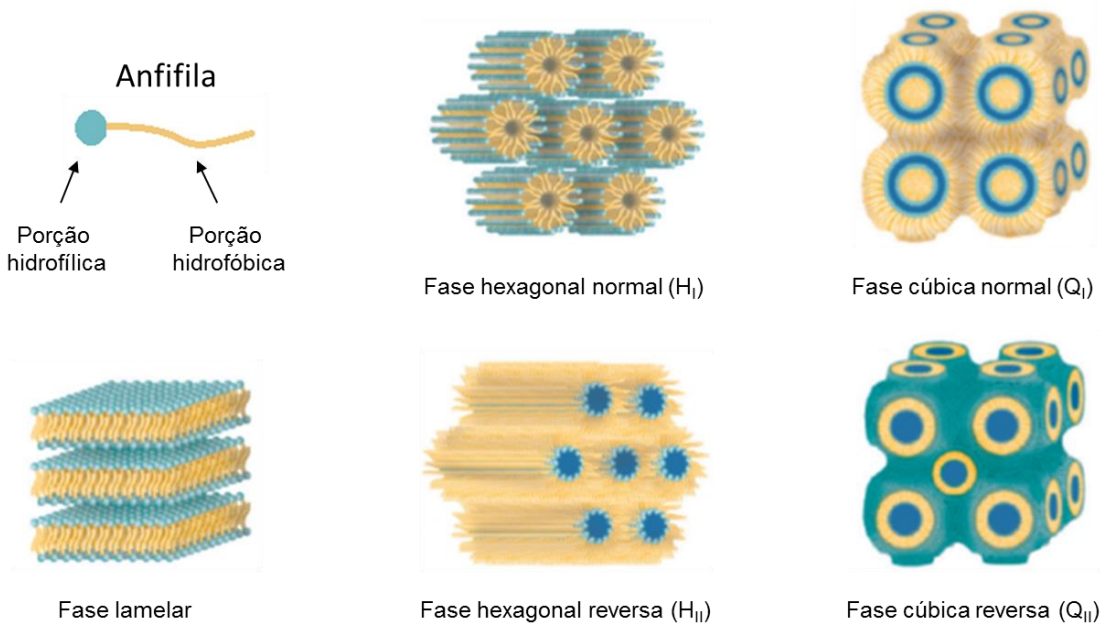

Figura 8 - Representação esquemática das diversas fases líquido-cristalinas formadas pela monoleína em presença de água. Adaptado de: ("Cubic Phase Particles in Drug Delivery", 2012).

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**.

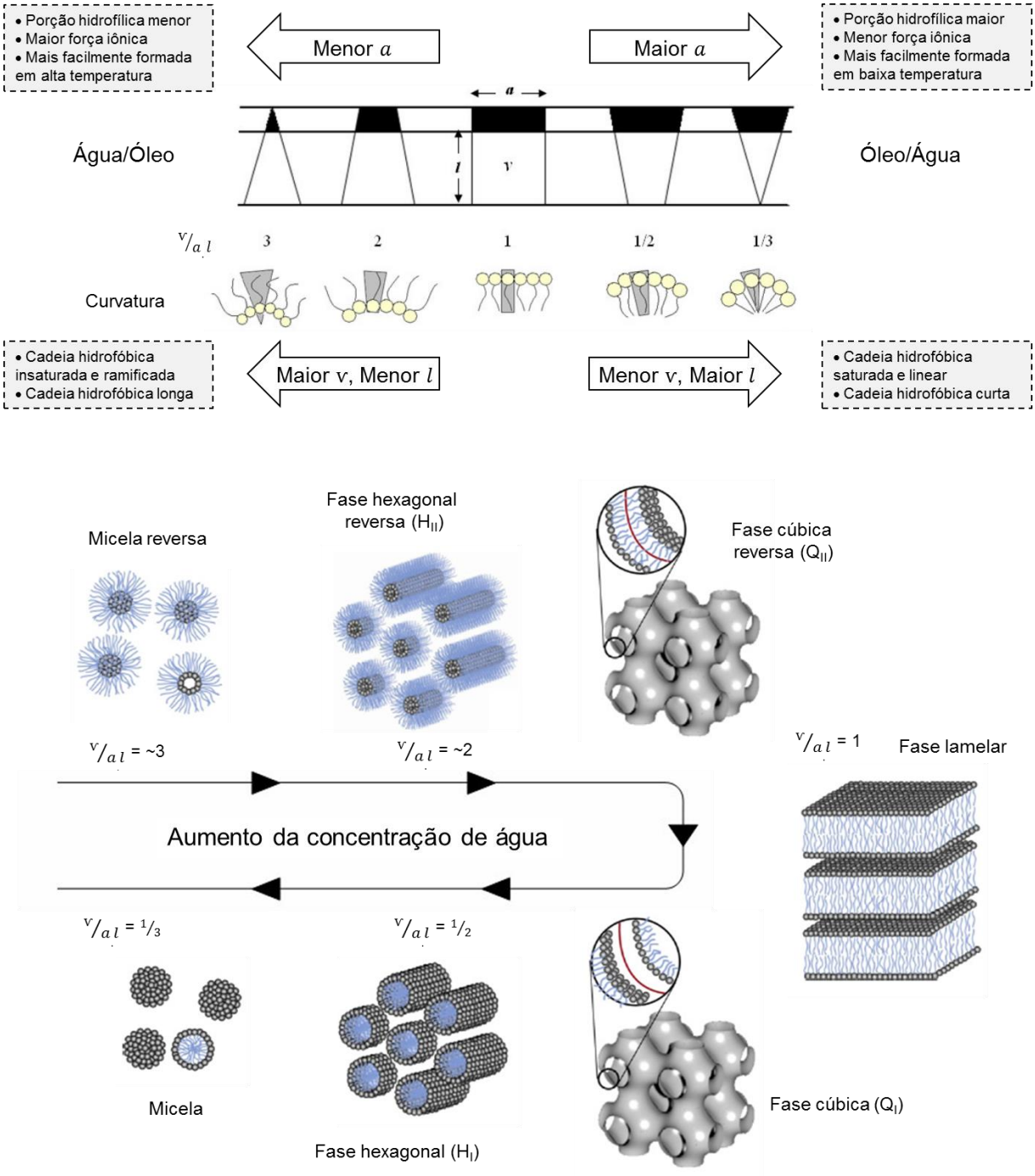

Figura 9 - Diagrama esquemático do impacto da estrutura lipídica, aumento da concentração de água e estímulos externos sobre o fator de empacotamento e curvatura. Adaptado de (NGUYEN, 2008; CHANG et al., 2015).

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).

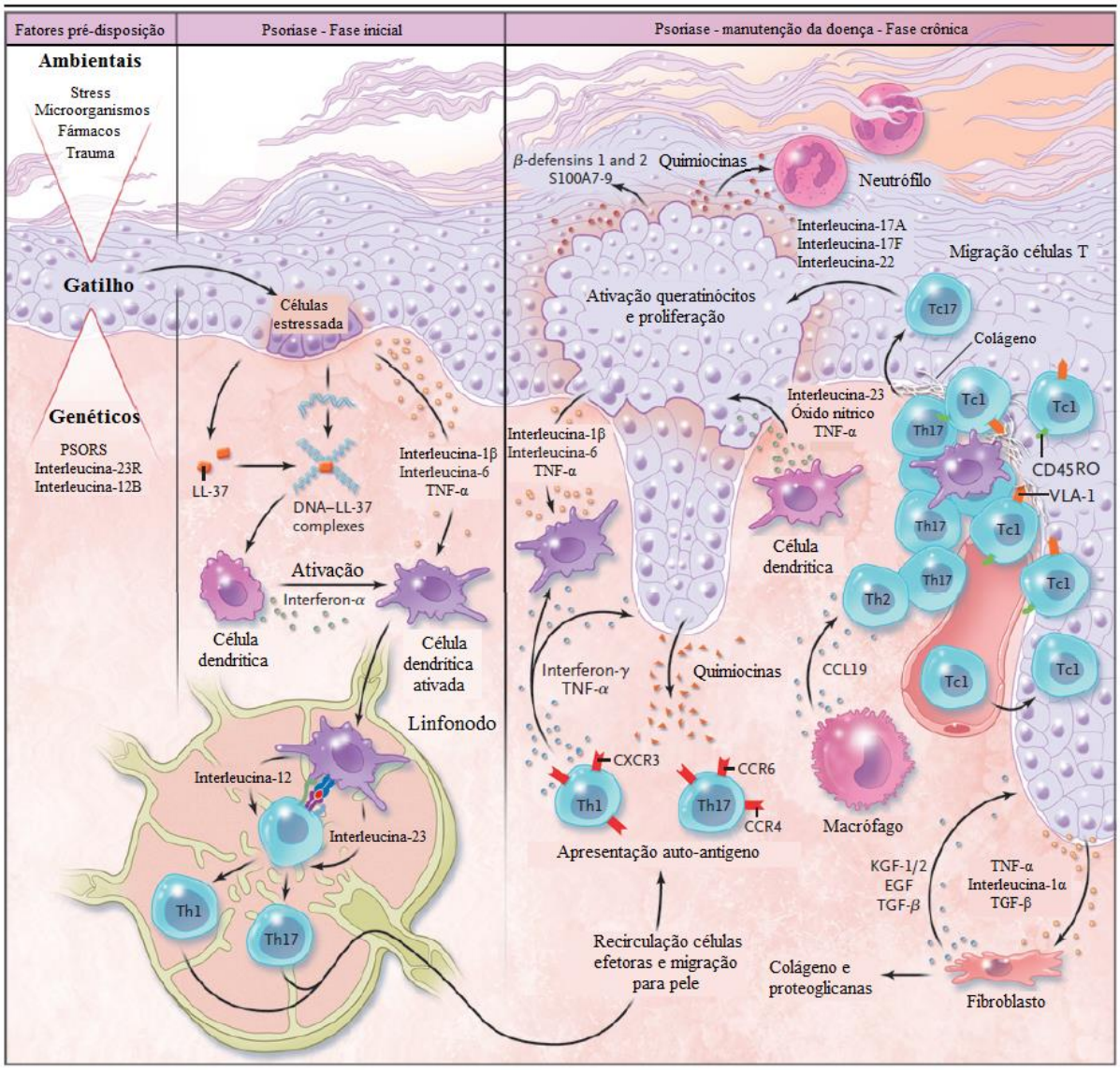

Figura 10 - Esquema evolutivo do quadro imunoinflamatório característico na psoríase. Adaptado de (NESTLE; KAPLAN; BARKER, 2009).

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.

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.