UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação *in vitro* e *in vivo* de nanodispersões líquido
cristalinas para veiculação de siRNA-TRP-1 para o tratamento
tópico do vitiligo**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Larissa Bueno Tofani

Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória
Lopes Badra Bentley

*Versão corrigida da **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 04/09/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Ribeirão Preto
2015

RESUMO

TOFANI, L.B. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* de nanodispersões líquido cristalinas para veiculação de siRNA-TRP-1 para o tratamento tópico do vitiligo.** 2015. 83f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O RNA de interferência (RNAi) é um processo envolvido com o silenciamento pós-transcricional de genes, sendo elucidado por moléculas de RNAs de dupla fita de 21-25 nucleotídeos, os *small interfering RNA* (siRNA), que ocorre naturalmente em uma ampla variedade de animais, plantas e microrganismos. Esse processo têm demonstrado potencial utilização para o tratamento de doenças em que se observa a super-expressão de genes, pois apresentam diversas vantagens como possibilidade de se utilizar esse mecanismo regulatório apenas pelo conhecimento da sequência do gene terapêutico, menores efeitos tóxicos e alta especificidade. Contudo, o principal desafio consiste no desenvolvimento de vetores seguros e eficazes que permitem a utilização do siRNA como terapia, visto que permitem a proteção do siRNA contra degradação enzimática, apresentam meia-vida prolongada na corrente sanguínea e propiciam um efetivo escape endossomal. Nesse sentido, nanopartículas de cristais líquidos associados ao polímero catiônico polietilenoimina (PEI) foram avaliadas como potenciais vetores não-virais para o siRNA específico para a proteína-1 relacionada à tirosinase (TRP-1), como alternativa para o tratamento tópico do vitiligo. Para isso, os cristais líquidos contendo o PEI foram complexados ao siRNA e avaliados quanto à estrutura líquido cristalina por microscopia de luz polarizada e por difração de raios-X a baixo ângulo (SAXS), tamanho de partícula/polidispersividade, potencial zeta e eficiência de complexação. A citotoxicidade dos sistemas foi avaliada em melanócitos melan-A pelo ensaio do MTT e por citometria de fluxo e, a avaliação da transfecção celular foi realizada por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo. Os diferentes sistemas contendo o polímero PEI apresentaram estruturas líquido cristalinas de fase hexagonal e de fase lamelar pela análise por SAXS, no entanto, a análise sob microscopia de luz polarizada, demonstrou estruturas de fase hexagonal, lamelar e isotrópica. A análise do tamanho de partícula mostrou a presença de sistemas nanoestruturados que foram capazes de se complexar ao siRNA na concentração de 10 μ M. Os estudos em cultura de célula demonstraram a maior viabilidade das células melan-A após tratamento com as nanodispersões líquido cristalinas formadas por monoleína (MO), ácido oleico (AO) e PEI, em relação ao polímero catiônico PEI em sua forma livre. Em relação à transfecção celular por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo foi possível observar a elevada eficiência de transfecção das nanodispersões líquido cristalinas formadas pelo sistema MO:AO:PEI. Resultados de inibição da expressão da proteína TRP-1 foram observadas em células melan-A por Western Blotting, após administração das nanodispersões líquido cristalinas associadas ao siRNA-TRP-1 específico. As nanodispersões líquido cristalinas estudadas também proporcionaram maior liberação de siRNA na pele em modelo animal. Esses resultados, demonstram a potencial utilização desses sistemas para a terapia anti-sense de doenças cutâneas como o vitiligo, representando assim, uma importante contribuição para a terapia gênica tópica desta doença.

Palavras-chaves: siRNA, nanodispersões líquido cristalinas, pele, vitiligo.

Introdução

1.1. Terapia Gênica: Utilização de RNA de interferência (RNAi)

Os genes são responsáveis por grande parte das doenças, seja pela ausência de codificação de determinadas proteínas, por codificar proteínas anormais ou por excesso de codificação, por isso tornam-se alvos extremamente importantes como forma de tratamento (MARTIMPREY et al., 2009).

Na terapia gênica, fragmentos de moléculas do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou moléculas do ácido ribonucleico (RNA) são entregues para o interior de células alvo para modular a expressão de proteínas alteradas, com o intuito de reverter a desordem biológica (CARRILLO et al., 2013). Esses pequenos fragmentos de oligonucleotídeos anti-sense bloqueiam a expressão de proteínas alvo super-expressas em diferentes níveis da expressão do gene, seja durante o processo de transcrição ou tradução (GANAS et al., 2014), se tornando uma estratégia promissora para o tratamento de diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, fibrose cística, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e doenças infecciosas (IBRAHEEM et al., 2014).

O RNA de interferência (RNAi) é processo biológico envolvido com o silenciamento pós-transcricional de genes (SHIMIZU et al., 2015), elucidado por moléculas de RNA de dupla fita (dRNA), que ocorre em uma ampla variedade de animais, plantas e microrganismos (KIM et al., 2015). Esse mecanismo de silenciamento gênico conservativo é uma proteção natural de células eucarióticas contra ácidos nucleicos invasivos de vírus e transposons. Essas células podem ser estimuladas por esses RNAs de dupla fita que degradam o RNA mensageiro (RNAm) alvo, resultando na inatividade do vírus/transposon (URYU et al., 2013).

O RNAi foi descrito pela primeira vez em petúnias por pesquisadores enquanto tentavam aumentar a atividade da enzima chalcona sintase para intensificar a coloração púrpura dessas flores (RESHI et al., 2014). Richard Jorgenséns e Joseph Mols introduziram múltiplas cópias do transgene envolvido com a produção desse pigmento e, ao contrário do que esperavam, observaram não só a inibição do transgene introduzido mas também do gene endógeno, resultando na obtenção de flores brancas ou irregularmente coloridas. Esse mecanismo passou a ser conhecido como co-supressão (SIFUENTES-ROMERO et al., 2011).

O mecanismo molecular que levava ao silenciamento de genes permaneceu desconhecido durante anos, até que os pesquisadores americanos Andrew Z. Fire e Craig C. Mello (1998), descobriram que a molécula de RNA de dupla fita poderia silenciar a expressão de genes, ao trabalharem com o nematóide *Carnorhabditis elegans* (MENCK, 2010). Esses pesquisadores observaram que o silenciamento da expressão do gene de interesse era mais efetivo quando injetaram uma molécula de RNA de dupla fita de sequência similar em relação às fitas de RNA simples *sense* e *antisense* administradas separadamente (SIFUENTES-ROMERO et al., 2011).

O mecanismo de RNAi se inicia pela clivagem de longas cadeias de RNAs de dupla fita em pequenos fragmentos (21-25 nucleotídeos) por meio da enzima denominada *Dicer*. Essas pequenas sequências, os *small interfering RNAs* (siRNAs), são rapidamente transportados para um complexo enzimático chamado *induced silencing complex RNA* (RISC) (GOMES et al., 2015). Em células de mamíferos, a proteína Argonauta 2 (Ago2) é o componente catalítico presente nesse complexo responsável pela clivagem do RNAm alvo. Após a separação do duplex da molécula de siRNA pela enzima Ago2, o complexo RISC se torna ativo com capacidade de degradar o RNAm alvo (DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007). A fita *sense* do siRNA é então eliminada, enquanto a fita *antisense* guia o complexo RISC até o RNAm alvo. Como a sequência de pares de base do siRNA é perfeitamente complementar ao RNAm alvo, o complexo RISC cliva o RNAm alvo, degradando-o (Figura 1) (HUANG; LIU, 2011; FRANÇA et al., 2010; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; GELEY; MÜLLER, 2004).

Os *microRNAs* (miRNAs) são originalmente formados no núcleo pela ação da enzima Drosha produzindo estruturas denominadas pré-miRNA. Essas estruturas são transportadas para o citoplasma formando miRNAs maduros com 22 pares de base por meio clivagem pela enzima Dicer, regulando a transcrição de genes ao se ligar à extremidade 3' UTR do RNAm alvo bloqueando a translação ou por facilitar a sua degradação (RESHI et al., 2014). Os *short hairpin RNAs* (shRNAs) são moléculas de RNA de dupla fita contendo uma alça de fita simples denominadas *hairpin*, com estruturas semelhantes ao miRNA, podendo ser sintéticos ou transcritos dentro das células por meio de vetores que codificam o shRNA, sendo processados pela enzima

Dicer, da mesma maneira que ocorre com siRNAs e miRNAs (FRANÇA et al., 2010; GELEY; MÜLLER, 2004).

Figura 1: Mecanismo de silenciamento gênico por RNAi. Adaptado de DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007.

Recentemente, a função de muitos genes foi elucidada pela análise funcional de RNAi (MIYAGISHI & TAIRA, 2003). Além de serem utilizados como uma ferramenta valiosa para pesquisa genômica funcional, os siRNAs também têm demonstrado um grande potencial em aplicações terapêuticas para o tratamento de doenças em que se observa mutações ou super-expressão de genes anormais (WANG et al., 2014).

O primeiro ensaio clínico utilizando siRNA foi realizado em fase 1b para avaliar a inibição de um alelo mutante para o tratamento da paquioniquia congênita, uma doença de pele autossômica causada por mutações em genes relacionados com a queratina, no entanto, devido a dor associada as injeções intradérmicas esses ensaios não prosseguiram para clínica (HEDGE et al., 2014).

Desde a primeira triagem em 2004, cerca de 20 ensaios clínicos utilizando siRNA foram realizados para o tratamento de várias doenças locais e sistêmicas. A maioria dos siRNAs livres administrados eram para o tratamento de doenças tópicas,

Introdução

no entanto, muitos ensaios foram encerrados devido à baixa eficácia terapêutica, efeitos fora do alvo e condições relacionadas ao custo dessa terapia (ZHUO et al., 2014). Atualmente, alguns ensaios clínicos utilizando siRNA como terapia permanecem em andamento (Tabela 1).

Tabela 1: Principais ensaios clínicos à base de siRNA em andamento. Adaptado de: ZHUO et al., 2014.

Via de administração	Estágio Clínico	Empresa	Doença Alvo
Subcutânea	II	Santaris	Hepatite C
Intravítrea	I	Quarck Pharma	Neuropatia óptica
Colírio	I	Sylentis	Olho seco/ Dor ocular
Injeção intravenosa	II	Quarck Pharma	Lesão renal aguda
Injeção intratumoral	I	Silenceed Ltd.	Câncer pancreático

O silenciamento utilizando-se siRNA criou um novo paradigma no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos em relação à terapêutica tradicional, pois apresenta a vantagem de não ter que entrar no núcleo da célula alvo uma vez que seu mecanismo de ação ocorre no citoplasma, além de possibilidade de se utilizar esse mecanismo regulatório apenas pelo conhecimento da sequência do gene terapêutico de interesse (GUO et al., 2010), possuir menores efeitos tóxicos e especificidade (BORGUETI-CARDOSO et al., 2014).

Desde a sua descoberta a um pouco mais de uma década, a tecnologia a base de siRNA já se tornou um potencial tratamento para diversas doenças, sendo a mais promissora dentre as classes de RNAi. Devido às novas estratégias em pesquisas para maximizar a utilização do siRNA como inibidor de alvos específicos, em um futuro próximo esse “fármaco de silenciamento de genes” ganhará a mesma importância dos fármacos convencionais para o tratamento de diversas doenças (DENG et al., 2014).

1.2. Terapia gênica em doenças cutâneas

A pele é o órgão mais acessível do corpo, representando uma importante via de administração para a terapia a base de siRNA (HEGDE et al., 2014). A aplicação

Introdução

tópica como terapia é uma estratégia atrativa para o tratamento de diversas doenças cutâneas por ser uma via não-invasiva, de fácil administração, requer baixa dosagem terapêutica, apresenta menores efeitos adversos sistêmicos, além de permitir o direcionamento seletivo para o alvo patológico (SIU et al., 2014).

A administração tópica do siRNA têm demonstrado potencial utilização para o tratamento de muitas doenças causadas por alterações na expressão de genes como na alopecia, paquioniquia congênita, hiperpigmentação, câncer e psoríase (CHONG et al., 2013).

Leachman e colaboradores (2008) demonstraram a promissora utilização da tecnologia do siRNA para o tratamento da paquioniquia congênita, doença de pele de caráter dominante associada com a mutação de genes envolvidos com a produção de queratina, pela inibição da expressão do gene alterado K6A-luciferase. Estudos realizados em melanoma, evidenciaram o silenciamento das proteínas ^{V600}EB-Raf e Akt3 por meio da administração de siRNA específico, resultando na inibição do desenvolvimento e crescimento dos tumores (FEDORENKO; PARAISO; SMALLEY, 2011; VICENTINI et al., 2013a). Em doenças alérgicas da pele, observou-se que a administração de siRNA específico levou à redução da expressão de CD86, intimamente relacionado com a resposta específica de células T (RITPRAJAK; HASLUGUCHI; AZIUNA, 2008). Na psoríase, uma doença de pele inflamatória crônica com produção exacerbada de citocina TNF- α , pesquisadores observaram que a administração de siRNA-TNF α específico poderia diminuir os efeitos da doença (VICENTINI et al., 2013b).

A pele é constituída por quatro camadas distintas: estrato córneo, epiderme viável, derme e o tecido conectivo subcutâneo. O estrato córneo é a camada mais externa da pele formada por uma matriz de 10 a 15 camadas de queratinócitos mortos e desidratados (corneócitos) que variam em espessura entre 10 a 15 μ m (DESAI; PATOLLA; SINGH, 2011; YARIV et al., 2010). Devido à sua composição e distribuição celular, o estrato córneo representa a principal barreira para a penetração de fármacos na terapia tópica (VICENTINI et al., 2013a) e, um pré-requisito para a entrega tópica do siRNA é superar as barreiras impostas pelo estrato córneo (LEE et al., 2014) (Figura 2). Por isso, o sucesso da utilização do siRNA depende de sistemas de liberação seguros e eficazes (XIAO et al., 2014).

Figura 2: Penetração do siRNA através do estrato córneo na pele. Adaptado de: HEGDE et al., 2014.

1.3. Sistemas carreadores para siRNA

Embora a utilização de siRNA como aplicação terapêutica seja altamente promissora, alguns desafios estão restritos à sua aplicação na clínica (KESHARWANI et al., 2012). Geralmente, apenas pequenas moléculas lipofílicas (< 500 Da) podem atravessar a pele em concentrações terapêuticas adequadas, fazendo com que a administração de siRNA pela via tópica seja um obstáculo, uma vez que essa molécula apresenta carga negativa, características hidrofílicas e é relativamente grande (~13 KDa) (CHEN et al., 2014a).

Devido à essas limitações, a utilização de sistemas carreadores é de suma importância para a administração do siRNA (RAGELLE; VANDERMEULEN; PRÉAT, 2013). As características ideais de um sistema carreador para siRNA incluem proteção contra degradação enzimática, boa compatibilidade tecidual, eficaz translocação pela membrana plasmática, meia-vida prolongada na corrente sanguínea, além de propiciar um efetivo escape endossomal (CHEN et al., 2014b).

Os dois principais vetores utilizados para o carregamento de siRNA incluem: i) os vetores virais, que introduzem o material genético na célula alvo utilizando-se de seu mecanismo natural de infecção celular e ii) os vetores não-virais (VIDEIRA et al., 2014).

Os vetores virais apresentam uma elevada eficiência de transfecção, no entanto, suas aplicações são restritas devido a importantes limitações tais como dificuldade de preparação, limitação no tamanho do gene carreado, potencial

patogenicidade e efeitos imunogênicos (LIU et al., 2013; EWE et al., 2014). Devido às desvantagens inerentes dos vetores virais, os vetores não-virais têm surgido como importantes sistemas carreadores de siRNA por serem biocompatíveis, fáceis de se produzir e relativamente seguros (HUO et al., 2015). Diferentes sistemas tipicamente catiônicos têm sido propostos para veiculação de siRNA tais como lipídeos, polímeros naturais e sintéticos, peptídeos de penetração celular e dendrímeros (GOODING et al., 2015; XUN et al., 2014).

Os polímeros catiônicos são uma classe de vetores não-virais que têm atraído muita atenção nas últimas décadas devido à sua capacidade em se condensar às moléculas de DNAs e RNAs, baixa imunogenicidade e possibilidade de modificação estrutural (HAN et al., 2015). Esses polímeros podem se complexar ao siRNA por meio de interações eletrostáticas entre a carga positiva do polímero e a carga negativa dos grupamentos fosfatos do siRNA, formando poliplexos que protegem o siRNA contra degradação enzimática, além de auxiliarem na entrada da célula alvo e facilitar o escape endossomal (SARDO et al., 2015).

A polietilenoimina (PEI) é um polímero catiônico sintético solúvel em água, disponível nas formas linear e ramificada (Figura 3) e em uma ampla variedade de tamanhos (0,8 - 800 KDa) (EWE et al., 2014), com habilidade de se condensar às moléculas de DNAs e RNAs em pH fisiológico, apresentando uma elevada eficiência de transfecção *in vitro* e *in vivo* (FERNANDES et al., 2013). Esse polímero apresenta um grupo de aminas que podem se protonar a cada terceira posição em pH fisiológico, permitindo a complexação aos ácidos nucleicos, sendo por isso amplamente explorado como vetor não-viral para introdução de moléculas de DNAs e RNAs em células alvo (GÜNTER et al., 2011; LIANG, et al., 2012).

Figura 3: Estruturas moleculares do polímero catiônico PEI. Adaptado de: MARTIMPREY et al., 2009.

Já é bem descrito em literatura que a citotoxicidade e eficiência de transfecção são altamente dependentes do peso molecular e da estrutura do PEI (EWE et al., 2014). Sabe-se que moléculas de PEI ramificadas de alto peso molecular como o de 25 KDa apresentam uma alta eficiência de transfecção celular, no entanto, estão associados à uma elevada citotoxicidade (LIU et al., 2011). Embora moléculas de PEI lineares de baixo peso molecular estimulem menores respostas anti-inflamatórias e sejam menos tóxicas, a liberação do siRNA desses complexos ainda é ineficiente (TSAI et al., 2011). Estudos comparativos entre nanopartículas utilizando-se o PEI nas formas linear e ramificada, demonstraram que a utilização do PEI na forma ramificada permitiu a obtenção de nanopartículas estáveis com carga positiva após complexação ao siRNA, com efetiva captação celular e maior atividade no silenciamento de genes (KWOK; HART, 2011).

Modificações químicas podem ser feitas para reduzir a natureza citotóxica do PEI, bem como para aumentar sua biocompatibilidade. Essas modificações incluem a conjugação com polímeros biodegradáveis como o polietilenoglicol (PEG), quitosana e ácido hialurônico (NGUYEN et al., 2014). A conjugação com o co-polímero PEG propicia a formação de uma camada hidrofílica ao redor do poliplexo ou da partícula, permitindo a diminuição na agregação desses sistemas por estabilização estérica, além de reduzir a toxicidade e aumentar a permanência na circulação sanguínea (KIM et al., 2012a). A redução na toxicidade pode ser explicada pela menor interação do poliplexo com a membrana celular, devido à diminuição da carga positiva da superfície da partícula (MOHAMMADI et al., 2015). Weber e colaboradores (2012) observaram que o complexo formado entre PEG-PEI-siRNA foi capaz de melhorar a entrega do siRNA para célula alvo, além de apresentar alta eficiência de transfecção em células T, capacidade em silenciar a expressão da proteína alvo GADPH e melhorar a biocompatibilidade do sistema.

Atualmente, a molécula do polímero PEI ramificada com tamanho de 25 KDa vêm sendo empregada como padrão ouro para transfecção de genes (XUN et al., 2014), sendo formado por 25% de aminas primárias, 50% de aminas secundárias e 25% de aminas terciárias. Os siRNAs podem se condensar às aminas primárias protonadas desse polímero por meio de interações eletrostáticas, propiciando a proteção do siRNA contra degradação enzimática e facilitando sua entrada nas

células. As aminas secundárias e terciárias facilitam o escape endossomal dos poliplexos, devido à sua capacidade de disruptura da membrana do endossomo após a entrada na célula alvo (YU et al., 2009).

Geralmente, os poliplexos entram nas células por meio de vesículas endossomais. Essas vesículas tornam-se cada vez mais ácidas à medida que sofrem maturação pelo acúmulo de prótons (pH 5-6) e, se fundem posteriormente aos lisossomos (pH 4-5). Por meio de enzimas lisossomais, os poliplexos podem ser degradados se não conseguirem “escapar” do endossomo (MA, 2014).

A liberação do poliplexo PEI/siRNA do endossomo é mediada pelo mecanismo conhecido por “efeito esponja de prótons”. Polímeros catiônicos como PEI possuem uma alta capacidade tamponante em uma ampla faixa de pH devido a presença de diferentes aminas protonáveis em sua estrutura, que possuem diferentes constantes de dissociação (pKas). Isso resulta no influxo de íons cloreto, prótons e água para o interior do endossomo, que se rompe devido à pressão osmótica, liberando o poliplexo para citoplasma, onde exerce seu efeito na regulação da expressão de genes (Figura 4) (BARRAT; FATTAL, 2009; TSENG; MOZUMDAR; HUANG, 2009; VARKOUHI et al., 2011).

Figura 4: Mecanismo de escape endossomal de poliplexos, conhecido como “efeito esponja de prótons”. Adaptado de: HUANG; LIU, 2011.

Os sistemas nanoparticulados têm demonstrado eficácia na entrega de siRNA para administração tópica (CHEN et al., 2014a). Esses sistemas apresentam potencial utilização como carreadores de siRNA pois podem prevenir efeitos fora do alvo celular,

além de facilitar a liberação intracelular desse material genético por mecanismos de captação celular e, promover proteção contra a degradação por nucleases séricas (MALAMAS et al., 2013). Em geral, partículas na faixa de 200 a 500 nm podem ser captadas pelas células alvo por mecanismos de endocitose. Consequentemente, partículas nessa faixa de tamanho são requeridas para veiculação de siRNA (REISCHL & ZIMER, 2009).

Além dos sistemas nanocarreadores, métodos físicos para entrega de siRNA têm sido estudados, tais como ultrassom hidrodinâmico, eletroporação e iontoforese. A eletroporação é uma técnica que consiste na aplicação de uma corrente elétrica externa que aumenta a permeabilidade de fármacos e material genético pela desestabilização da membrana plasmática (VICENTINI et al., 2013a). O ultrassom hidrodinâmico envolve a injeção relativamente rápida de um grande volume de solução para corrente sanguínea, afim de superar as barreiras físicas das membranas endoteliais e celular (INOUE et al., 2014).

A iontoforese é um método de entrega não-invasivo, que facilita a permeação de moléculas carregadas por meio da aplicação de uma corrente elétrica (KIGASAWA et al., 2010). Kigasawa e colaboradores (2010) avaliaram o efeito da iontoforese para permeação de siRNA na epiderme de ratos, demonstrando a potencial utilização desse método para o tratamento de doenças cutâneas, uma vez que os resultados demonstraram um acúmulo do siRNA na epiderme viável e inibição da transcrição do gene endógeno *interleucina-10* (IL-10).

1.4. Cristais líquidos como sistemas carreadores de siRNA

Nos últimos anos, os cristais líquidos têm atraído muito interesse como sistemas carreadores devido à possibilidade em formar partículas por meio da utilização de metodologias simples. Além disso, esses sistemas podem melhorar a biodisponibilidade, solubilidade e proteção dos fármacos (KRAINEVA et al., 2005; ZENG et al., 2012; VICENTINI et al., 2013b). Os cristais líquidos são mesofases organizadas com propriedades intermediárias entre líquidos (fluidez) e sólidos (estrutura cristalina ordenada) (GOSENCA; BESTER-ROGAC; GASPERLIN, 2013), podendo ser formados pela adição de solventes (cristais líquidos liotrópicos) ou por

ajustes na temperatura (cristais líquidos termotrópicos). As três principais classes de cristais líquidos são as estruturas lamelar, hexagonal e cúbica (Figura 5), que podem ser identificadas pela técnica de difração de raios-X (MILAK & ZIMMER, 2015).

Figura 5: Diferentes estruturas de cristais líquidos formadas pelo sistema monoleína em presença de água, sendo (a) fase lamelar; (b) fase cúbica reversa; (c) fase cúbica normal e (d) fase hexagonal reversa. Adaptado de: ZABARA & MEZZENGA, 2014.

A fase lamelar é formada por bicamadas lipídicas dispostas em uma rede bidimensional, delimitadas por água. As cabeças polares das moléculas do tensoativo ficam em contato com o meio aquoso, enquanto as cadeias de hidrocarbonetos se organizam paralelamente à fim de evitar a porção aquosa. Essa fase é bastante fluída e as bicamadas podem se deslizar facilmente umas sobre as outras, sendo caracterizada por anisotropia em mosaico fluído planar e/ou cruzeiros de malta (TAVANO et al., 2013; TYLE, 1989).

A fase hexagonal é caracterizada por longas estruturas cilíndricas dimensionais, podendo existir em duas principais formas: (a) fase reversa, que ocorre quando a cabeça polar dos grupamentos anfifílicos se encontram na porção interior do cilindro e os grupamentos não polares ao seu redor e (b) fase normal, caracterizada pela presença dos grupamentos polares anfifílicos na porção externa do cilindro (BORGHETTI-CARDOSO et al., 2014). Sob microscopia de luz polarizada apresentam estruturas na forma de estrias (MÜLLER-GOYMMAN, 2004).

A fase cúbica apresenta-se como gel transparente, viscoso, isotrópico e termodinamicamente estável em presença de água. Essa mesofase é formada por uma bicamada lipídica curva e contínua de aproximadamente 3,5 nm que se estende em três dimensões, separados por uma camada aquosa de aproximadamente 5 nm quando hidratado (GUO et al., 2010).

Os cristais líquidos são facilmente formados por lipídeos anfifílicos em excesso de água (OKAWARA et al., 2014). O monoleato de glicerina, também conhecido por monoleína (MO) (Figura 6) é um lipídeo atóxico, biodegradável e biocompatível, utilizado na indústria alimentícia para a produção de pães, bolos, margarinas, sorvetes e gomas de mascar, além de atuar como agente emulsionante em âmbito farmacêutico (MILAK & ZIMMER, 2015). Ao promover a extração da ceramida e melhorar a fluidez dos lipídeos que constituem o estrato córneo, a monoleína auxilia a permeação de fármacos, podendo formar diferentes estruturas líquido cristalinas, como fase cúbica e hexagonal reversa, dependendo da quantidade de água e temperatura do sistema (LOPES et al., 2006b).

Figura 6: Estrutura molecular da monoleína. Fonte: LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011.

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

De maneira geral, a geometria molecular apresenta um papel importante na determinação das mesofases líquido cristalinas. O fator de empacotamento (FE) pode prever a geometria molecular do sistema anfifila:água e influenciar a formação das estruturas líquido cristalinas, de tal modo que: se o fator de empacotamento for menor que 1 ($FE < 1$) ocorre a formação de micelas normais e fase hexagonal normal, se o fator de empacotamento for igual a 1 ($FE = 1$), o sistema se organiza de modo a formar fases lamelares, no entanto, se o fator de empacotamento for maior que 1 ($FE > 1$) observa-se a formação de estruturas reversas, como fase hexagonal reversa, cúbica reversa e micelas invertidas (Figura 7) (GUO et al., 2010).

Figura 7: Diferentes mesofases líquido cristalinas que podem ser obtidas de acordo com o fator de empacotamento (FE). Sendo v o volume da cadeia hidrofóbica, a a área do domínio polar da anfifila e l o comprimento da anfifila. Adaptado de: GUO et al, 2010.

A literatura relata que mesofases líquido cristalinas cúbicas formadas pelo sistema monoleína:água à temperatura ambiente, podem sofrer transição para mesofase hexagonal reversa sob temperaturas acima de 85°C (LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011). No entanto, para que ocorra a formação da mesofase hexagonal reversa à temperatura ambiente, um terceiro componente deve ser adicionado a esse sistema como, por exemplo, o ácido oleico (LOPES et al., 2006b). Variações na pressão, concentração de sais e pH também podem influenciar a transição de mesofases nos sistemas líquido cristalinos (PHAN et al., 2011).

Estruturas líquido cristalinas formados por MO apresentam propriedades interessantes para aplicação tópica, como: i) alta permeabilidade pela presença de estruturas relacionadas com formação dos lipídeos (MO), ii) propriedades bioadesivas, iii) capacidade de incorporar substâncias com diferentes solubilidades, iv) proteção contra degradação física e enzimática e v) liberação sustentada de fármacos (GAN et al., 2010).

As fases líquido cristalinas podem ser dispersas em nanopartículas por metodologias que utilizam alta energia como ultrasonicação e homogeneização de

alta pressão (AVACHAT & PARPANI, 2015). A literatura têm demonstrado que essas nanopartículas podem manter sua estabilidade, morfologia e estrutura interna associado à fase em gel, além de apresentarem pequeno tamanho de partícula, boa compatibilidade e, capacidade de incorporar fármacos com propriedades hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas (LI et al., 2013). Em relação à fase em gel, as nanopartículas apresentam as vantagens de terem uma maior área superficial e fluidez, além da possibilidade de serem incorporadas à outras formulações (LOPES et al., 2006a). O poloxamer 407[®] é frequentemente utilizado para manter a estabilidade estérica das partículas líquido cristalinas dispersas (AVACHAT & PARPANI, 2015).

Cristais líquidos de monoleína foram explorados por Lopes e colaboradores (2006a e 2006b) e Borgueti-Cardoso e colaboradores (2014 e 2015). Os resultados demonstraram um aumento na incorporação e liberação tópica de macromoléculas *in vitro* e *in vivo*, apresentando-se promissores para o carreamento de siRNAs na pele. Nanopartículas líquido cristalinas de fase hexagonal reversa foram avaliadas por Vicentini e colaboradores (2013b) como sistemas para veiculação de siRNA. Esses pesquisadores observaram um aumento na penetração de siRNA na pele de camundongos *hairless* após 24 e 48 h da aplicação dos diferentes sistemas em relação aos controles utilizados e, inibição da proteína alvo GADPH, demonstrando a promissora utilização desses sistemas para veiculação tópica de siRNA.

1.5. Vitiligo como doença cutânea alvo

Os melanócitos são células responsáveis pela síntese da melanina, pigmento biológico que confere a coloração da pele e dos cabelos, em organelas denominadas melanossomas (KIM et al., 2013a). O pigmento melanina apresenta função de proteção contra danos causados pelos raios ultravioleta, radiação ionizante e agentes oxidantes (CHEN et al., 2014c).

A enzima tirosinase bem como a proteína -1 relacionada à tirosinase (TRP-1) e a proteína- 2 relacionada à tirosinase (TRP-2) são conhecidas por regular a síntese da melanina. Resumidamente, a melanogênese se inicia pela hidroxilação da L-tirosina em L- diidroxifenilalanina (DOPA) catalisada pela enzima tirosinase, seguido pela oxidação da DOPA em dopaquinona (NG et al., 2014). A proteína-2 relacionada

Introdução

à tirosinase (TRP-2) catalisa a formação do 5-6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) proveniente da dopaquinona, enquanto a proteína -1 relacionada à tirosinase (TRP-1) oxida o 5-6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) em ácido carboxílico indol-quinona, que é posteriormente convertido à melanina (KIM et al., 2013b).

O vitiligo é uma doença despigmentar caracterizada pela presença de máculas brancas na região da pele e dos cabelos, em decorrência da perda progressiva dos melanócitos (OISO et al., 2013; GONG et al., 2015), acometendo aproximadamente entre 0,5 a 2% da população mundial (Figura 8) (RICHMOND; FRISOLI; HARRIS, 2013). Recentemente, o vitiligo têm sido classificado em localizado (focal, unilateral/segmentado e mucoso), generalizado (vulgaris, acrofacial e misto) e universal, de acordo com a extensão das lesões despigmentadas (LOTTI & D'ERME, 2014).

Figura 8: Lesões despigmentadas em pacientes com vitiligo em decorrência da perda de melanócitos das regiões afetadas. FONTE: ALIKHAN et al., 2011; ALSUBAIT et al., 2015.

Embora o vitiligo não seja considerado uma doença grave, os efeitos psicológicos decorrentes das lesões despigmentadas podem frequentemente causar estresse e baixa autoestima, principalmente em pessoas com a pele negra, já que o

aparecimento das manchas é mais proeminente e, em regiões visíveis onde o vitiligo se desenvolve como na face, mãos e braço (DWIVEDI et al., 2015).

Atualmente, várias terapias estão disponíveis para o tratamento do vitiligo como corticoides de uso tópico e sistêmico, inibidores de calcineurina tópicos, vitamina D, fototerapias e modalidades cirúrgicas. No entanto, esses tratamentos não conseguem repigmentar lesões na pele glabra e, dificilmente levam à total repigmentação da pele afetada, além de apresentarem muitos efeitos adversos que comprometem à adesão dos pacientes ao tratamento. Assim, pesquisas que visem um melhor entendimento da doença pela identificação de novos alvos terapêuticos se fazem importantes (ALSUBAIT; MULEKAR; AL ISSA, 2015; MOREIRA et al., 2015).

Muitas teorias têm sido propostas para elucidar os mecanismos de destruição dos melanócitos no vitiligo, dentre elas as teorias autoimune, neurogênica e autodestrutiva (AL FAHAAD, 2015). Dentro desse contexto, a associação com doenças autoimunes como doença de Addison, hipotireoidismo, anemia perniciosa, lúpus eritematoso sistêmico, juntamente com a resposta positiva ao tratamento com imunossuppressores (esteroides tópicos e tracolimus), presença de células autoimunes como células T reativas, associado à presença de anticorpos contra diferentes antígenos associados aos melanócitos, suportam a hipótese autoimune do vitiligo (SANDOVAL-CRUZ et al., 2011).

O mecanismo da destruição dos melanócitos no vitiligo ainda não está totalmente elucidado, no entanto, acredita-se que haja uma alteração na função das células T reguladoras mediada por antígenos melanocíticos, induzindo a proliferação de células T CD4 e T CD8. Esse aumento nos níveis de T CD8 estimulam a produção de citocinas IL-6 e IL-13, favorecendo a morte dos melanócitos por apoptose (DWIVEDI et al., 2015) (Figura 9). Essas alterações em células T CD4 do tipo T *helper* Th1, Th2, Th17 e células T citotóxicas auto reativas específicas para os melanócitos têm sido relacionadas como alterações autoimunes dos pacientes que apresentam vitiligo (TEMBHRE et al., 2013). A proliferação de células B e a produção de auto anticorpos específicos também estão associadas aos processos imunológicos alterados que ocorrem em pacientes com a doença (SILVERBERG, 2014).

Figura 9: Mecanismos de destruição dos melanócitos no vitiligo mediada por células T e células B. Adaptado de: DWIVEDI et al., 2015.

A presença de auto anticorpos no vitiligo está relacionada com a extensão da despigmentação e atividade da doença, sendo verificados em 50% de pacientes com vitiligo incipiente e, esse valor pode se aproximar a 93% em pacientes com a forma extensiva da doença (STEIRNER & VILLAS, 2004). Esses anticorpos contra antígenos associados aos melanócitos demonstraram a capacidade em induzir a apoptose de melanócitos *in vitro* (SPEECKAERT; SPEECKAERT; VAN GEEL, 2015).

Embora estejam relacionadas com a síntese do pigmento melanina (NG et al., 2014), a enzima tirosinase, a proteína-1 relacionada à tirosinase (TRP1) e a proteína-2 relacionada à tirosinase (TRP-2) apresentam um papel importante no desenvolvimento do vitiligo. Essas proteínas passam a atuar como antígenos de diferenciação melanocítica que estimulam a destruição autoimune dos melanócitos, resultando na despigmentação característica da doença (RAUSCH et al., 2010).

TRP-1 é uma glicoproteína transmembrânica de 75 KDa expressa na superfície de melanócitos normais e de melanócitos associados ao melanoma, sendo produzida no retículo endoplasmático e transportada através do complexo de Golgi para

organelas específicas denominadas melanossomas. Quando atinge a maturação, também recebe a denominação de *gp75* (GHANEM & FABRICE, 2011).

Jimbow e colaboradores (2001) demonstraram um aumento na expressão da proteína TRP-1 em culturas de melanócitos humanos com vitiligo quando comparado a cultura de melanócitos humanos normais, sugerindo que a alteração na expressão de TRP-1 poderia estimular o desenvolvimento do vitiligo. Esses pesquisadores também detectaram a imunoprecipitação do anticorpo específico anti-TRP-1 (α -PEP-1) em duas linhagens de melanócitos humanos com vitiligo, em relação às culturas de melanócitos normais e de melanoma primário, onde não foi evidenciada a presença desses anticorpos.

Essien e Harris (2014) verificaram a indução do vitiligo em camundongos *C57Bl/6*, ao administrarem uma vacina viral (*rVV*) com o gene para a expressão de TRP-1. Esses pesquisadores observaram a despigmentação dos folículos pilosos em 80% dos camundongos, demonstrando que a despigmentação nesse modelo *in vivo* estava relacionada com a produção de anticorpos específicos que induziam a morte dos melanócitos, fundamentando a hipótese da função antigênica de TRP-1 no vitiligo. A imunização passiva e ativa contra o antígeno melanossomal TRP-1 também foi capaz de induzir a hipopigmentação dependente de anticorpos em camundongos (DBA/2, SJL, C3H/HeN e C57Bl/6), evidenciando a capacidade desses anticorpos específicos em induzir a doença em modelos *in vivo* saudáveis (TRCKA et al., 2002).

Devido à importância e o potencial terapêutico da utilização do siRNA para a terapia gênica de diversas doenças cutâneas, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de nanodispersões líquido cristalinas como vetores não-virais para o carregamento de siRNA específico para TRP-1, proteína alvo que atua como antígeno melanocítico envolvida com a destruição dos melanócitos no vitiligo. Estudos de transfeccção celular e eficácia da supressão da expressão da proteína TRP-1 em células de melanócitos não tumorigênicos de linhagem melan-A, associado aos ensaios de penetração cutânea em modelo animal, indicarão a potencial utilização dessas formulações como alternativa para o tratamento tópico do vitiligo.

Conclusões

Conclusões

Os estudos realizados nesse trabalho permitiram concluir que:

- As associações padronizadas de MO, AO, PEI e fase aquosa propiciaram a obtenção de estruturas líquido cristalinos de fase hexagonal para o sistema MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89 p/p/p/p), caracterizados por microscopia de luz polarizada pela presença de estrias e por SAXS. Já o sistema MO:AO:PEI:FA (8:1:0,5:90,5 p/p/p/p) apresentou estruturas na forma de cruzes de malta, características de fase lamelar e, presença de fase isotrópica por microscopia de luz polarizada, com picos característicos de fase lamelar por SAXS;
- As dispersões na fase em gel de fases hexagonal e lamelar em excesso de fase aquosa obtidas por ultrassom em sonificador de haste em agulha em ciclo contínuo por 4 min a uma frequência de 2kHz formaram nanodispersões com tamanho de 150-240 nm e polidispersividade (Pdl) entre 0,1 e 0,4. Em relação ao potencial zeta, observou-se a presença de um potencial positivo para o sistema formado por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89 p/p/p/p) e de um potencial negativo para o sistema MO:AO:PEI:FA (8:1:0,5:90,5 p/p/p/p);
- As nanodispersões obtidas permitiram a complexação ao siRNA na concentração de 10 μ M. Essa complexação foi desfeita pelo método de competição com poliânions, demonstrando que o siRNA pode ser liberado desses complexos de maneira intacta e estável, condição importante para a sua atividade;
- As análises conjuntas de viabilidade celular por MTT e por citometria de fluxo permitiram concluir que as nanodispersões líquido cristalinas avaliadas apresentaram uma maior viabilidade em células *melan-A* quando comparado apenas ao polímero PEI nas concentrações avaliadas;
- As nanodispersões estudadas formadas por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89 p/p/p/p) e MO:AO:PEI:FA (8:1:0,5:90,5 p/p/p/p) apresentaram capacidade de transfecção celular, bem como a inibição *in vitro* da expressão da proteína-1 relacionada à tirosinase (TRP-1) quando as nanodispersões foram associadas ao siRNA-TRP-1 específico;

Conclusões

- Associado ao fato da eficiência de complexação ao siRNA e das capacidades de transfecção celular e de silenciamento da proteína-1 relacionada à tirosinase (TRP-1) utilizando-se siRNA-TRP-1 específico, as nanodispersões líquido cristalinas também demonstraram um aumento na penetração cutânea *in vivo* do siRNA-FAM em relação aos controles estudados;
- A realização do trabalho resultou no desenvolvimento de um sistema de liberação nanoestruturado baseado em cristas líquidos para o carreamento de siRNA específico para o silenciamento da proteína-1 relacionada à tirosinase (TRP-1), com características adequadas de tamanho e polidispersividade, eficiência de complexação ao siRNA, baixa citotoxicidade e principalmente eficiência na transfecção celular e no silenciamento da proteína alvo específica. O fato desses sistemas também permitirem a maior penetração cutânea *in vivo* do siRNA, demonstra o potencial das nanodispersões líquido cristalinas estudadas para a terapia anti-sense de doenças cutâneas como o vitiligo, representando assim, uma importante contribuição para a terapia gênica tópica desta doença.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

AL FAHAAD, H. A. Clinico-epidemiological profile of vitiligo patients in Najran Region, Saudi Arabia. **J Dermatology Dermatologic Surg**, v. 19, p. 31-35, 2015.

ALIKHAN, A.; FELSTEN, L. M.; DALY, M.; PETRONIC-ROSIC, V. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. **J Am Acad Dermatol**, v. 65, p. 473-491, 2011.

ALSUBAIT, N.; MULEKAR, S.; AL ISSA, A. Failure of non-cultured melanocyte–keratinocyte transplantation in periungual vitiligo: A case report. **J Dermatology Dermatologic Surg**, 2015.

AMAR-LEWIS, E.; AZAGURY, A.; CHINTAKUNTA, R.; GOLDBART, R.; TRAITTEL, T.; PRESTWOOD, J.; LANDESMAN-MILO, D.; PEER, D.; KOST, J. Quaternized starch-based carrier for siRNA delivery: from cellular uptake to gene silencing. **J Control Release**, v. 185, p. 109-120, 2014.

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

AVACHAT, A. M.; PARPANI, S. S. Formulation and development of bicontinuous nanostructured liquid crystalline particles of efavirenz. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 126, p. 87-97, 2015.

BARRATT, G.; FATTAL, E. Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. **Br J Pharmacol**, v. 157, p. 179-194, 2009.

BENDER, J.; ERICSON, M. B.; MERCLIN, N.; IANI, V.; ROSÉN, A.; ENGSTRÖM, S.; MOAN, J. Lipid cubic phases for improved topical drug delivery in photodynamic therapy. **J Control. Release**, v. 106, p. 350–360, 2005.

BIVAS-BEITA, M.; ROMEIJIN, S.; JUNGINGER, H. E.; BORCHARD, G. PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 58, .p 1-6, 2004.

BORGUETI-CARDOSO, L.N.; DEPIERI, L.V.; DINIZ, H.; CALZZANI, R.A.J.; FANTINI, M.C.A.; BENTLEY, M.V.L.B. Self-assembling gelling formulation based on a

Referências Bibliográficas

crystalline-phase liquid as a non-viral vector for siRNA delivery. **Eur J Pharm Sci**, v. 58, p. 72-82, 2014.

BORQUETI-CARDOSO, L. N.; DEPIREI, L. V.; KOOJIMANS, S. A. A.; DINIZ, H.; CALZANNI, R. A. J.; VICENTINI, F. C. T. M.; DER MELL, R. V.; 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. **Eur J Pharm Sci**, v. 74, p. 103-117, 2015.

CARRILLO C, SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, N.; GARCÍA-MONTOYA, E.; PÉREZ-LOSANO, P.; SUÑÉ-NEGRE, J.M.; TRICÓ, J.R.; SUÑÉ, C.; MIÑARRO, M. DNA delivery via cationic solid lipid nanoparticles (SLNs). **Eur J Pharm Sci**, v. 49, p. 157-165, 2013.

CHEN, M.; ZAKREWSKY, M.; GUPTA, V.; ANSELMO, A.C.; SLEE, D. H., MURASKI, J.A.; MITRAGOTRI, S. Topical delivery of siRNA into skin using SPACE-peptide carriers. **J Control Release**, v. 179, p. 33-41, 2014a.

CHEN, Y.; GU, H.; ZHANG, D.S.-Z.; LI, F.; LIU, T.; XIA, W. Highly effective inhibition of lung cancer growth and metastasis by systemic delivery of siRNA via multimodal mesoporous silica-based nanocarrier. **Biomaterials**, v. 35, p. 10058-10069, 2014b.

CHEN, Y.; FENG, P.; SHANG, Y.; XU, Y.-J.; WANG, C. Biosynthesis of non-melanin pigment by a divergent polyketide synthase in *Metarhizium robertsii*. **Fungal Genet Biol**, 2014c.

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

COHEN-AVRAHAMI, M.; SHAMES, A. I.; OTTAVIANI, M. F.; ASERIN, A.; GARTI, N. On the correlation between the structure of lyotropic carriers and the delivery profiles of two common NSAIDs. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 122, p. 231-240, 2014.

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.

Referências Bibliográficas

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

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

DONG, Y. D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **Int J Pharm**, v. 417, p. 101-111, 2011.

DWIVEDI, M.; KEMP, E. H.; LADDHA, N. C.; MANSURI, M. S.; WEETMAN, A. P.; BEGUM, R. Regulatory T cells in vitiligo: Implications for pathogenesis and therapeutics. **Autoimmun Rev**, v. 14, p. 49-56, 2015.

ESSIEN, K. I.; HARRIS, J. E. Animal models of vitiligo: Matching the model to the question. **Dermatologica Sin**, v. 32, p. 240-247, 2014.

EWE, A.; SCHAPER, A.; BARNERT, S.; SCHUBERT, R.; TEMME, A.; BAKOWSKY, U.; AIGNER, A. Storage stability of optimal liposome-polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery. **Acta Biomater**, v. 10, p. 2663-2673, 2014.

FARID, M. M.; HATHOUT, R. M.; FAWZY, M.; ABOU-AISHA, K. Silencing of the scavenger receptor (Class B - Type 1) gene using siRNA-loaded chitosan nanoparticles in a HepG2 cell model. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 123, p. 930-937, 2014.

FEDORENKO, I. V.; PARAISO, K. H.; SMALLEY, K. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. **Biochem Pharmacol**, v. 82, p. 201-209, 2011.

FERNANDES, J.C.; QIU, X.; WINNIK, F.M.; BENDERDOUR, M.; ZHANG, X.; DAI, K. SHI, G. Linear polyethylenimine produced by partial acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline) for DNA and siRNA delivery in vitro. **Int J Nanomedicine**, v. 8p. 4091-4102, 2013.

Referências Bibliográficas

FRANÇA, N.R.; JÚNIOR, D.M.; LIMA, A.B.; PUCCI, F.V.C.; ANDRADE, L.E.C.; SILVA. Interferência de RNAi: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Ver Bras Reumatol**, v. 50, p. 695-709, 2010.

GAN, L.; HAN, S.; SHEN, J.; ZHU, C.; ZHANG, X.; GAN, Y. Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: Improving precocular retention and ocular bioavailability. **Int J Pharm**, v. 396, p. 179-187, 2010.

GANAS, C.; WEIB, A.; NAZARENUS, M.; RÖSLER, S.; KISSEL, T.; RIVERA_GIL, P.; PARAK, W.J. Biodegradable capsules as non-viral vectors for in vitro delivery of PEI/siRNA polyplexes for efficient gene silencing. **J Control Release**, v. 196, p. 133-138, 2014.

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

GELEY, S.; MÜLLER, C. RNAi: ancient mechanism with a promising future. **Exp Gerontol**, v. 39, p. 985-998, 2004.

GHANEM, G.; FABRICE, J. Tyrosinase related protein 1 (TYRP1/gp75) in human cutaneous melanoma. **Mol Oncol**, v. 5, p. 150-155, 2011.

GOMES, M.J.; MARTINS, S.; SARMENTO, B. siRNA as a tool to improve the treatment of brain diseases: Mechanism, targets and delivery. **Ageing Res Ver**, v. 21, p. 43-54, 2015.

GONG, Q.; LI, X.; SUN, J.; DING, G.; ZHOU, M.; ZHAO, W.; LU, Y. The effects of calcipotriol on the dendritic morphology of human melanocytes under oxidative stress and a possible mechanism: is it a mitochondrial protector? **J Dermatol Sci**, v. 77, p. 117-124, 2015.

GONSENCA, M.; BESTER-ROGAC, M.; GASPERLIM, M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. **Eur J Pharm Sci**, v. 50, p. 114-122, 2013.

GOODING, M.; MALHOTRA, M.; McCHARTY, D.J.; GODINHO, B.M.D.C.; CRYAN, J. F.; DARCY, R.; O'DRISCOLL, C.M. Synthesis and characterization of rabies virus

Referências Bibliográficas

glycoprotein-tagged amphiphilic cyclodextrins for siRNA delivery in human glioblastoma cells: In vitro analysis. **Eur J Pharm Sci**, v. 71, p. 80-92, 2015.

GOYAL, R.; TRIPATHI, S. K.; TYAGI, S.; SHARMA, A.; RAM, K. R.; CHOWDHURI, D. K.; SHUKLA, Y.; KUMAR, P.; GUPAT, K. C. Linear PEI nanoparticles: efficient pDNA/siRNA carriers in vitro and in vivo. **Nanomedicine**, v. 8, p. 167-175, 2012.

GRAYSON, A.C.R; DOODY, A.M.; PUTMAN, D. Biophysical and Structural Characterization of Polyethylenimine-Mediated siRNA Delivery in Vitro. **Pharm Res**, v. 23, p.1868-1876, 2006.

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. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 77, p. 438-449, 2011.

GUO P.; COBAN, O.; SNEAD, N.M.; TREBLEY, J.; HOEPRICH, S.; GUO,S.; SHU,Y. Engineering RNA for Targeted siRNA Delivery and Medical Application. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, p. 650-666, 2010.

GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R. J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discov Today**, v. 15, p. 1034-1040, 2010.

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

HAN, J.; CAI,, J.; BORJIHAN, W.; GANBOLD, W.; RANA, T. M.; BAIGUDE, H. Preparation of novel curdlan nanoparticles for intracellular siRNA delivery. **Carbohydr Polym**, v. 117, p. 324-330, 2015.

HEDGE, V.; HICKERSON, R.P.; NAINAMALAI, S.; CAMPBELL, P.A.; SMITH, F.J.D.; McLEAN, W.H.I.; PEDRIOLLI, D.M.L. In vivo gene silencing following non-invasive siRNA delivery into the skin using a novel topical formulation. **J Control Release**, v. 196, p. 355-362, 2014.

HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINE, J. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; LOPEZ, R. V. F. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **Int J Pharm**, v. 329, p. 88-93, 2007.

Referências Bibliográficas

HÖBEL, S.; LOOS, A.; APPELHANS, D.; SCHWARZ, S.; SEIDEL, J.; VOIT, B.; AIGNER, A. Maltose- and maltotriose-modified, hyperbranched poly(ethylene imine)s (OM-PEIs): Physicochemical and biological properties of DNA and siRNA complexes. **J Control Release**, v. 149, p. 146-158, 2011.

HUANG, L.; LIU, Y. In vivo delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles. **Annu Res Biomed Eng**, v. 13, p. 507-530, 2011.

HUH, M. S.; LEE, S-Y.; PARK, S.; LEE, S.; CHUNG, H.; LEE, S.; CHOI, Y.; OH, Y-K.; PARK, J. H.; JEONG, S. Y.; CHOI, K.; KIM, K.; KWON, I. C. homing glycol chitosan/polyethylenimine nanoparticles for the systemic delivery of siRNA in tumor-bearing mice. **J Control Release**, v. 144, p. 134-143, 2010.

HUO, H.; GAO, Y.; WANG, Y.; ZHANG, J.; WHANG, Z.; JIANG, T.; WANG, S. Polyon complex micelles composed of pegylated polyasparthydrazide derivatives for siRNA delivery to the brain. **J Colloid Interface Sci**, v. 447, p. 8-15, 2015.

IBRAHEEM, D.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Gene therapy and DNA delivery systems. **Int J Pharm.**, v. 449, p. 70-83, 2014.

INOUE, H.; ARAI, Y.; KISHIDA, T., SHIN-YA, M.; TERAUCHI, R.; NAKAGAWA, S.; SAITO, M.; TSUCHIDA, S.; INOUE, A.; SHIRAI, T.; FUJIWARA, H.; MAZDA, O.; KUBO, T. Sonoporation-mediated transduction of siRNA ameliorated experimental arthritis using 3 MHz pulsed ultrasound. **Ultrasonics**, v. 54, p. 874-881, 2014.

JIMBOW, K.; CHEN, H.; PARK, J-S.; THOMAS, P. D. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. **Br J Dermatol**, v. 144, p. 55-65, 2001.

KESHARWANI, P.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N.K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. **Biomaterials**, v. 33, 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. **Int J Pharm**, v. 83, p. 157-160, 2010.

KIM, N.; JIANG, D.; JACOBI, A.M.; LENNOX, K.A.; ROSE, S.D.; BEHLKE, M.A.; SALEM, A.K. Synthesis and characterization of mannosylated pegylated polyethylenimine as a carrier for siRNA. **Int J Pharm**, v. 427, p. 123-133, 2012a.

Referências Bibliográficas

KIM, N.; JIANG, D.; JACOBI, A. M.; LENNOX, K A.; ROSE, S. D.; BEHLKE, M. A.; SALEM, A. K. Synthesis and characterization of mannosylated pegylated polyethylenimine as a carrier for siRNA. **Int J Pharm**, v. 427, p. 123-133, 2012b.

KIM, E. S.; JO, Y. K.; PARK, S. J.; CHANG, H.; SHIN, J. H.; CHOI, E. S.; KIM, J. B.; SEOK, S. H.; KIM, J-S.; OH, J. S.; KIM, M-H.; LEE, E. H. ARP101 inhibits α -MSH-stimulated melanogenesis by regulation of autophagy in melanocytes. **FEBS Lett**, v. 587, p. 3955-3960, 2013a.

KIM, S. S.; KIM, M-J.; CHOI, Y. H.; KIM, B. K.; KIM, K. S.; PARK, K. J.; PARK, S. M.; LEE, N. H.; HYUN, C-G. Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 3, p. 617-622, 2013b.

KIM, Y. H.; SOUMAILA ISSA, M.; COOPER, , A. M. W.; ZHU, K. Y. RNA interference: Applications and advances in insect toxicology and insect pest management. **Pestic Biochem Physiol**, v. 1, p. 1-9, 2015.

KNOW, A.; HART, S. L. Comparative structural and functional studies and nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. **Nanomedicine**, a. 7. P. 210-219, 2011.

KOMPELLA, U.B.; AMRITE, A.C.; RAVI, R.P.; DURAZO, S.A. Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and Imaging. **Prog Ret Eye Res**, v.36, p. 172-198, 2013.

KRAINEVA, J.; NARAYANAN, R. A.; KONDRASHKINA, E.; THIYAGARAJAN, P.; WINTER, R. Kinetics of lamellar-to-cubic and inter-cubic phases transitions of pure and cytochrome C containing monoolein dispersions monitored by time-resolved small-angle x-ray diffraction. **Langmuir**, v. 21, p. 3559-3571, 2005.

LEACHMAN, S. A.; HICKERSON, R. P.; HULL, P. RP.; SMITH, F. J.; MILSTONE, L. M.; LANE, E. B.; BALE, S. J.; ROOP, D. R.; McLEAN, W. H. I.; KASPAR, R. L. Therapeutic siRNAs for dominant genetic skin disorders including pachyonychia congenita. **J Dermatol Sci**, v. 51, p. 151-157, 2008.

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. **J Control Release**, v. 141, p. 339-346, 2010.

Referências Bibliográficas

LEE, Y.; LEE, S.H.; KIM, J.S.; MARUYAMA, A.; CHEN, X.; PARK, T.G. Controlled synthesis of PEI-coated gold nanoparticles using reductive catechol chemistry for siRNA delivery. **J. Controlled Release**, v. 155, 3-10, 2011.

LEROY, P.; DEVAU, N.; REVIL, A.; BIZI, M. Influence of surface conductivity on the apparent zeta potential of amorphous silica nanoparticles. **J Colloid Interface Sci**, v. 410, p. 81-93, 2013.

LI, J.; WU, L.; WU, W.; WANG, B.; WANG, Z.; XIN, H.; XU, Q. A potential carrier based on liquid crystal nanoparticles for ophthalmic delivery of pilocarpine nitrate. **Int J Pharm**, v. 455, p. 75-84, 2013.

LIANG, B.; He, M.L; XIAO, Z.P; Li, Y.; CHAN, C.; KUNG, H.F.; SHUAI, X.T.; PENG, Y. Synthesis and characterization of folate-PEG-grafted-hyperbranched-PEI for tumor-targeted gene delivery. **Biochemic Biophys Res Commun**, v. 367, p.874-880, 2008.

LIANG, Y.; LIU, Z.; SHUAI, X.; WANG, W.; LIU, J.; BI, W.; WANG, C.; JING, X.; LIU, Y.; TAO, E. Delivery of cationic polymer-siRNA nanoparticles for gene therapies in neural regeneration. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 421, p. 690-695, 2012.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: drug delivery and crystallization applications. **J Colloid Interface Sci**, v. 356, p. 375-386, 2011.

LIU, T.; LIU, Z.; WANG, Y.; LIANG, Y.R.; WEN, X.; HU, J.; YANG, X.; LIU, J.; XIAOU, S.; CHENG, D. Investigation of the performance of PEG-PEI/ROCK-II-siRNA complexes for Alzheimer's disease in vitro. **Brain Res**, v. 1490, p. 43-51, 2013.

LIU, Y.; SAMSONOVA, O.; SPROAT, B.; MERKEL, O.; KISSEL, T.. Biophysical characterization of hyper-branched polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-mono-methoxyl-poly(ethylene glycol) copolymers (hy-PEI-PCL-mPEG) for siRNA delivery. **J Control Release**, v. 153, p. 262-268, 2011.

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

LOPES, L.B.; LOPES, J.L.C.; OLIVEIRA, D.C.R.; THOMAZINI, J.A.; FANTINI, M.C.; COLLET, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Liquid crystalline phases monoolein and water for

Referências Bibliográficas

topical delivery of cyclosporin A: characterization and study os *in vitro* and *in vivo* delivery. **Eur J Pharm Biopharm**, 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. **Eur J Pharm Sci**, v. 32, p. 209–215, 2007.

LOTTI, T.; D'ERME, A.M. Vitiligo as a systemic disease. **Clin Dermatol**, v. 32, p. 430-434, 2014.

LUPU, A. R.; POPESCU, T. The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. **Toxicol in vitro**, v.27, p.1445-1450, 2013.

MA, D. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. **Nanoscale**, v. 6, p. 6415-6425, 2014.

MALAMAS, A.S.; GUJRATI, M.; KUMMITHA, C.M.; XU, R.; LU, Z-R. Design and evaluation of new pH-sensitive amphiphilic cationic lipids for siRNA delivery. **J Control Release**, v. 171, p. 296-307, 2013.

MARTIMPREY, H.; VAUTHIER, C.; MALVY, C.; COUVREUR, P. Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 71, p. 490-504, 2009.

MELO, F. H. M; MOLOGNONI, F.; MORAIS, A. S.; TORICELLI, M.; MOURO, M. G.; HIGA, E. M. S.; LOPES, J. D.; JASIULIONIS, M. G. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling as a key mediator of melanocyte malignant transformation associated with sustained stress conditions. **Free Radic Biol Med**, v. 50, p. 1263-1273, 2011.

MENK, C.F.M. A nova grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para clínica. **Estudos avançados**, v.24, p. 99-108, 2010.

MESQUITA, N.; PORTUGAL, A.; PIÑAR, G.; LOUREIRO, J.; COUTINHO, A.P.; TROVÃO, J.; NUNES, I.; BOTELHO, M.L. Flow cytometry as a tool to assess the effects of gamma radiation on the viability growth and metabolic activity of fungal spores. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 2012.

Referências Bibliográficas

MILAK, S.; ZIMMER, A. Glycerol monooleate liquid crystalline phases used in drug delivery systems. **Int J Pharm**, v. 478, p. 569-587, 2015.

MIMI, H.; HO, K. M.; SIU, Y. S.; WU, A.; LI, P. Polyethyleneimine-based core-shell nanogels: a promising siRNA carrier for argininosuccinate synthetase mRNA knockdown in HeLa cells. **J Control Release**, v. 158, p. 123-130, 2012.

MITRI, K.SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELM, C.; MULLER, R.H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. **Int J Pharm**, v. 414, p. 267-275, 2011.

MIYAGISHI, M.; TAIRA, K. Strategies for Generation of an siRNA Expression Library Directed Against the Human Genome. **Oligonucleotides**, v. 13, p. 325-333, 2003.

MOHAMMADI, M., SALMASI, Z.; HASHEMI, M.; MOSAFFA, F.; ABNOUS, K.; RAMEZANI, M. Single-walled carbon nanotubes functionalized with aptamer and piperazine-polyethylenimine derivative for targeted siRNA delivery into breast cancer cells. **Int J Pharm**, v. 485, p. 50-60, 2015.

MOREIRA, C G.; CARRENHO, L. Z. B.; PAWLOSKI, P. L.; SOLEY, B. S.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M F. Pre-clinical evidences of *Pyrostegia venusta* in the treatment of vitiligo. **J Ethnopharmacol**, v. 168, p. 315-325, 2015.

MOSKALENSKY, A. E.; CHERNYSHEV, A. V.; YURKIN, M. A.; NEKRASOV, V. M.; POLSHCHITSIN, A. A.; PARKS, D. R.; MOORE, W. A.; FILATENKOV, A.; MALTSEV, V. P.; ORLOVA, D. Y. Dynamic quantification of antigen molecules with flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 148, p. 66-74, 2015.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 58, p. 343-356, 2004.

NG, L-T.; LIN, L-T.; CHEN, C-L.; CHEN, H-W., WU, S-J.; LIN, C-C. Anti-melanogenic effects of δ -tocotrienol are associated with tyrosinase-related proteins and MAPK signaling pathway in B16 melanoma cells. **Phytomedicine**, v. 21, p. 978-983, 2014.

NGUYEN, K.C.T.; MUTHIAH, M.; ISLAM, M.A.; KALASH, R.S.; CHO, C-S.; PARK, H.; LEE, I-K.; KIM, H-J.; PARK, I-K.; CHO, K.A. Selective transfection with osmotically active sorbitol modified PEI nanoparticles for enhanced anti-cancer gene therapy. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 119, p. 126-136, 2014.

Referências Bibliográficas

OISO, N.; SUZUKI, T.; WATAYA-KANEDA, M.; TANEMURA, A.; TANIOKA, M.; FUJIMOTO, T.; FUKAI, K.; KAWAKAMI, T.; TSUKAMOTO, K.; YAMAGUCHI, Y.; SANO, S.; MITSUHASHI, Y.; NISHIGORI, C.; MORITA, A.; NAKAGAWA, H.; MIZOGUCHI, M.; KATAYAMA, I. Guidelines for the diagnostics and treatment of vitiligo in Japan. **J Dermatol**, v.40, p.344-354, 2013.

OKAWARA, M.; HASHIMOTO, F.; TODO, H.; SUGIBAYASHI, K.; TOKUDOME, Y. Effect of liquid crystals with cyclodextrin on the bioavailability of a poorly water-soluble compound, diosgenin, after its oral administration to rats. **Int J Pharm**, v. 472, p. 257-261, 2014.

OZPOLAT, B.; SOOD, A.K.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. **J Intern Med**, v. 267, p. 44-53, 2010.

PHAN, S.; FONG, W.; KIRBY, N.; HABLEY, Y.; BOYD, B J. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. **Int J Pharm**, v. 421, p. 176-182, 2011.

QI, R.; KIU, S.; CHEN, J.; XIAO, H.; YAN, L.; HUANG, Y.; JING, X. Biodegradable copolymers with identical cationic segments and their performance in siRNA delivery. **J Controlled Release**, v. 159, p. 251-260, 2012.

RAGELLE, H.; VANDERMEULEN, G.; PRÉAT, V. Chitosan-based siRNA delivery systems. **J Control Release**, v. 172, p. 207-218, 2013.

RAUSCH, M. P.; IRVINE, K. R. ANTONY, P. A.; ausch MP, Irvine KR, RESTIFO, N. P.; CRESSWELL, P.; HASTINGS, K. T. GILT accelerates autoimmunity to the melanoma antigen tyrosinase-related protein 1. **J Immunol**, v. 185, p. 2828-2835, 2010.

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

RESHI, M.L; WU, J.L.; WANG, H.V.; HONG, J.R. RNA interference technology used for the study of aquatic virus infections. **Fish Shellfish Immunol**, v. 40, p. 14-23, 2014.

RICHMOND, J. M.; FRISOLI, M. J.; HARRIS, J. E. Innate immune mechanisms in vitiligo: danger from within. **Curr Opin Immunol**, v. 25, p. 676-682, 2013.

Referências Bibliográficas

RITPRAJAK, P.; HASHIGUCHI, M.; AZUMA, M. Topical application of cream-emulsified CD86 siRNA ameliorates allergic skin disease by targeting cutaneous dendritic cells. **Mol Ther**, v. 16, p. 1323-330, 2008.

SANDERSON, B. A.; ARAKI, N.; LILLEY, J L.; GUERRERO, G.; LEWIS, L. K. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. **Anal Biochem**, v. 454, p. 44-52, 2014.

SANDOVAL-CRUZ, M.; GARCÍA-CARRASCO, M.; SÁNCHEZ-PORRAS, R.; MENDOZA-PINTO, C.; JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, M.; MUNGUÍA-REALPOZO, P.; RUIZ-ARGÜELLES, A. Immunopathogenesis of vitiligo. **Autoimmun Rev**, v. 10, p. 762-765, 2011.

SARDO, C.; FARRA, R.; LICCIARDI, M.; DAPAS, B.; SCIALABBA, C.; GIAMMONA, G.; GRASSI, M.; GRASSI, G.; CAVALLARO, G. Development of a simple, biocompatible and cost-effective Inulin-Diethylenetriamine based siRNA delivery system. **Eur J Pharm Sci**, v. 75, p. 60-71, 2015.

SHIMIZU, T.; YAEHASHI, H.; ITO, T.; KANEMATSU, S. Systemic RNA interference is not triggered by locally-induced RNA interference in a plant pathogenic fungus, *Rosellinia necatrix*. **Fungal Genet Biol**, v. 76, p. 27-35, 2015.

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

SILVERBERG, N. B. Pediatric vitiligo. **Pediatr Clin North Am**, v. 61, p. 347-366, 2014. SIU, K.S.; CHHEN, D. ZHENG, X.; ZHANG, X.; JOHNSTON, N.; LIU, Y.; YUAN, K.; KOROPATNICK, J.; GILLIES, E.R.; MIN, W.P. Non-covalently functionalized single-walled carbon nanotube for topical siRNA delivery into melanoma. **Biomaterial**, v. 35, p. 3435-3442, 2014.

SPEECKAERT, R.; SPEECKAERT, M. M. VAN GEEL, N. Why treatments do(n't) work in vitiligo: An autoinflammatory perspective. **Autoimmun Rev**, v. 14, p. 332-340, 2015.

STEINER, D.; VILLAS, R. T.; BEDIN, V.; STEINER, T.; MORAES, M. B. Vitiligo. Artigo de Revisão / Review Article. **An Bras Dermatol**, v. 79, p. 335-351, 2004.

Referências Bibliográficas

STOCKERT, J.C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R.W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemic**, v. 114, p.785-796, 2012.

SWAMI, A.; GOUYAL, R.; TRIPATHI, S. K.; SINGH, N.; KATIYAR, N.; MISHRA, A. K.; GUPTA, K. C. Effect of homobifunctional crosslinkers on nucleic acids delivery ability of PEI nanoparticles. **Int J Pharm**, v. 374, p. 125-138, 2009.

SWAMI, A.; KURUPATI, R. K.; PATHAK, A.; SINGH, Y.; KUMAR, P.; GUPTA, K. C. A unique and highly efficient non-viral DNA/siRNA delivery system based on PEI-bisepoxide nanoparticles. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 362, p. 835-841, 2007.

TAMURA, A.; YUI, N. Cellular internalization and gene silencing of siRNA polyplexes by cytotocleavable cationic polyrotaxanes with tailored rigid backbones. **Biomaterials**, v. 34, p. 2480-2491, 2013.

TANAKA, K.; ZANAZAWA, T.; OGAWA, T.; TAKASHINA, Y.; FUKUDA, T.; OKADA, H. Disulfide crosslinked stearyl carrier peptides containing arginine and histidine enhance siRNA uptake and gene silencing. **Int J Pharm**, v. 398, p. 219-224, 2010.

TAVANO, L.; GENTILE, L.; OLIVIERO ROSSI, C.; MUZZALUPO, R. Novel gel-niosomes formulations as multicomponent systems for transdermal drug delivery. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 110, p. 281-288, 2013.

TEMBHRE, M. K.; SHARMA, V. K.; SHARMA, A.; CHATTOPADHYAY, P.; GUPTA, S. T helper and regulatory T cell cytokine profile in active, stable and narrow band ultraviolet B treated generalized vitiligo. **Clin Chim Acta**, v. 424, p. 27-32, 2013.

TIDWELL, T. J.; DE PAULA, R.; SMADI, M. Y.; KEASLER, V. V. Flow cytometry as a tool for oilfield biocide efficacy testing and monitoring. **Int Biodeterior Biodegradation**, v. 98, p. 26-34, 2015.

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 Res**, v. 68, p. 7638-7649, 2008.

TRCKA, J.; MOROI, Y.; CLYNES, R.A.; GOLDBERG, M.; BERGTOLD, A.; PERALES, M-A.; MA, M. FERRONE, C. R.; CARROL, M. C.; RAVETCH, J.V.; HOUGHTON, A.N.

Referências Bibliográficas

Redundant and Alternative Roles for Activating Fc Receptors and Complement in an Antibody-Dependent Model of Autoimmune Vitiligo. **Immunity**, v. 16., p. 861-868, 2002.

TROIBER, C.; KASPER, J. C.; MILANI, S.; SCHEIBLE, M.; MARTIN, I.; SCHAUBHUT, F.; KÜCHLER, S.; RÄDLER, J.; SIMMEL, F. C.; FRIESS, W.; WAGNER, E. Comparison of four different particle sizing methods for siRNA polyplex characterization. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 84, p. 255-264, 2013.

TSAI, L-R.; CHEN, M-H.; CHIEN, C-T, CHEN, M-K.; LIN, F-S.; LIN, K. M-C.; HWU, Y-K.; YANG, C-S.; LIN, S-Y. A single-monomer derived linear-like PEI-co-PEG for siRNA delivery and silencing. **Biomaterials**, v. 32, p. 3647-3653, 2011.

TSENG, Y.; MOZUMDAR, S.; HUANG, L. Lipid –based systemic delivery of siRNA. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, p. 721-731, 2009.

TURCHIELLO, R. F.; VENA, F. C. B.; MAILLARD, P.; SOUZA, C. S.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT). **J Photochem Photobiol B Biol**, v. 70, p. 1–6, 2003.

TYLE, P. Liquid Crystalline and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: Polymer and aggregate systems**. New York: VCH Publishers, 1989. chapter 4, p. 125-162, 1989.

URYU, O.; KAMAE, Y.; TOMIOKA, K.; YOSHII, T. Long-term effect of systemic RNA interference on circadian clock genes in hemimetabolous insects. **J Insect Physiol**, v. 59, p. 494–499 , 2009.

VARKOUHI, A. K.; SCHOLTE, M.; STORM, G.; HAISMA, H. J. Endosomal scape pathways foe delivery of biological. **J Control Release**, v. 151, p. 220-228, 2011.

VICENTINI, F.T.M.C.; CARDOSO, L.B.; 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. **Pharm Res**, v. 30, p. 915-931, 2013a.

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

Referências Bibliográficas

nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 83, p. 16-24, 2013b.

VIDEIRA, M.; ARRANJA, A; RAFAEL, D.; GASPAR, R. Preclinical development of siRNA therapeutics: towards the match between fundamental science and engineered systems. **Nanomedicine**, v. 10. p. 689-702, 2014.

WANG, N.; HSU, C.; ZHU, L.; TSENG, S.; HSU, J.P. Influence of metal oxide nanoparticles concentration on their zeta potential. **J Colloid Interface Sci**, v.407, p.22-28, 2013.

WEBER, N.D.; MERKEL, O.M.; KISSEL, T., MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.Á. PEGylated poly(ethylene imine) copolymer-delivered siRNA inhibits HIV replication in vitro. **J Control Release**, v. 157, p. 55-63, 2012.

XIAO, J.; DUAN, X.; MENG, Q.; YIN, Q.; ZHANG, Z.; YU, H.; CHEN, L.; GU, W.; LI, Y. Effective delivery of p65 shRNA by optimized Tween 85-polyethyleneimine conjugate for inhibition of tumor growth and lymphatic metastasis. **Acta Biomater**, v. 10, p. 2674-2683, 2014.

XU, D.M.; YAO, S.D.; LIU, Y.B.; SHENG, K.L.; HONG, J.; GONG, P.J.; DONG, L. Size-dependent properties of M-PEI nanogels for gene delivery in cancer cells. **Int. J. Pharm**, v. 338, p. 291-296, 2007.

XUN, M-M.; LIU, Y-H.; GUO, Q.; ZHANG, J.; ZHANG, Q-F.; WU, W-X, YU, X-Q. Low molecular weight PEI-appended polyesters as non-viral gene delivery vectors. **Eur J Med Chem**, v. 78, p. 118-125, 2014.

YANG, S-C.; PAIK, S-Y-R.; RYU, L.; CHOI, K-O.; KANG, T. S.; LEE, J. K.; SONG, C. W.; KO, S. Dynamic light scattering-based method to determine primary particle size of iron oxide nanoparticles in simulated gastrointestinal fluid. **Food Chem**, v. 161, p. 185-191, 2014.

YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A., GARTI, N. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 78, p. 185-192, 2010.

YU, J-H, QUAN, J-S.; HUANG, J.; WANG, C-Y.; SUN, B.; NAH, J-W.; CHO, M-H.; CHO, C-S. Alpha,beta-poly(L-aspartate-graft-PEI): A pseudo-branched PEI as a gene

Referências Bibliográficas

carrier with low toxicity and high transfection efficiency. **Acta Biomater**, v. 5, p. 2485-2494, 2009.

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

ZENG, N.; HU, Q.; LIU, Z.; GAO, X.; HU, R.; SONG, Q.; GU, G.; XIA, H.; YAO, L.; PANG, Z.; JIANG, X.; CHEN, J.; FANG, L. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded DSPE-PEG-liquid crystalline nanoparticles (LCNPs) for improved bioavailability. **Int J Pharm**, v. 424, p. 58-66, 2012.

ZHANG, J.; DONG, B.; ZHENG, L.; LI, N.; LI, X. Lyotropic liquid crystalline phases formed in ternary mixtures of 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide/p-xylene/water: a SAXS, POM, and rheology study. **J Colloid Interface Sci**, v. 321, p. 159-165, 2008.

ZHAO, Y.; ZHENG, C.; ZHANG, L.; CHEN, Y.; YE, Y.; ZHAO, M. Knockdown of STAT3 expression in SKOV3 cells by biodegradable siRNA-PLGA/CSO conjugate micelles. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 127, p. 155-163, 2015.

ZHENG, M.; LIBRIZZI, D.; KILIÇ, A.; LIU, Y.; RENZ, H.; MERKEL, O. M.; KISSEL, T. Enhancing in vivo circulation and siRNA delivery with biodegradable polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly(ethylene glycol) copolymers. **Biomaterials**, v. 33, p. 6551-6558, 2012.

ZHENG, W.; WANG, Z.; LIU, F.; MI, Q.; WU, J. Study on the microstructure and rheological property of fish oil lyotropic liquid crystal. **Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp**, v. 385, p. 47-54, 2011.

ZHOU, L.; CHEN, Z.; CHI, W.; YANG, X.; WANG, W.; ZHANG, B. Monomethoxy poly (3-hydroxybutyrate)-graft-hyper-branched polyethylenimine copolymers for siRNA delivery. **Biomaterials**, v. 33, p. 2334-2344, 2012.

ZHU, X.; MASON, G. Passivated gel electrophoresis of charged nanospheres by light-scattering video tracking. **J Colloid Interface Sci**, v. 428, p. 199-207, 2014.