UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópico
para veiculação de siRNA na terapia gênica da córnea:
gel termorreversível e nanodispersões de cristal líquido**

Thais Fedatto Abelha

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica
para veiculação de siRNA na terapia gênica da córnea:
gel termorreversível e nanodispersões de cristal líquido**

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: Thais Fedatto Abelha

Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória Lopes
Badra Bentley

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 10/10/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2012

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

Abelha, Thais Fedatto

Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica para veiculação de siRNA na terapia gênica da córnea: gel termorreversível e nanodispersões de cristal líquido. Ribeirão Preto, 2012.

88 p.; 30cm.

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

Orientador: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

1. Terapia gênica; 2. *small interference* RNA; 3. Aplicação ocular; 4. Gel *in situ*; 5. Nanopartícula; 6. Cristal líquido

RESUMO

ABELHA, T. F. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica para veiculação de siRNA na terapia gênica da córnea: gel termorreversível e nanodispersões de cristal líquido**. 2012. 88f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O conhecimento do genoma humano e os avanços na biologia molecular levaram a descoberta de mecanismos celulares importantes. A terapia gênica surgiu com a proposta de interferir na fisiologia das células, que apresentam alguma disfunção causadora de uma doença, trazendo a possibilidade de tratamento para incontáveis enfermidades. Na tecnologia de RNA de interferência pequenos fragmentos de RNA de fita dupla (*small interference* RNA, siRNA) são utilizados para inibir a expressão de genes específicos. O olho tem sido um dos órgãos alvo para o uso desse tipo de tecnologia e, além disso, a córnea é uma membrana atrativa devido ao fácil acesso e a existência de diversas enfermidades que acometem a visão. Para aumentar a biodisponibilidade e viabilizar a administração de siRNA utilizando um polímero catiônico, uma formulação termorreversível com quitosana e outra composta de cristais líquidos funcionalizados com ácido hialurônico foram estudadas como possíveis sistemas de liberação ocular de siRNA, sendo que ambas são inéditas para aplicação tópica e oftálmica de siRNA. O gel termorreversível de poloxamer 407 foi associado a dois diferentes tipos de quitosana (LMW com 92,2% de desacetilação e MMW com 77,0% de desacetilação). Ambas as formulações apresentaram características desejáveis tanto como sistema de liberação de genes, tanto por apresentarem residual positivo e capacidade de complexar o siRNA, quanto como sistema compatível com via tópica ocular, devido ao comportamento reológico pseudoplástico. A quitosana LMW e a adição de NaCl à formulação alteraram a $T_{sol/gel}$ do poloxamer; somente a associação com a quitosana MMW apresentou $T_{sol/gel}$ adequada. Os sistemas contendo poloxamer em associação com os dois diferentes tipos de quitosana não promoveram a penetração do siRNA *in vitro* em córnea bovina nas condições experimentais utilizadas. O sistema líquido cristalino foi desenvolvido com monoleína (MO), polietilenimina (PEI), ácido hialurônico (HA) e fase aquosa. A formação de fases cristalinas foi avaliada por microscopia de luz polarizada e a estrutura das mesofases foi confirmada pela difração de raios X a baixo ângulo. O sistema líquido cristalino, composto de uma mistura de cristais de fase cúbica e hexagonal, foi disperso em nanopartículas de tamanho satisfatório, de aproximadamente 166 nm. Os sistemas apresentaram características desejáveis como sistema de liberação de genes, como potencial zeta adequado, capacidade de complexar sem degradar o siRNA e não foram citotóxicos em fibroblastos L929, além de serem compatíveis com a via ocular por serem isotônicos. A dispersão de cristais de MO/PEI foi capaz de transfectar as células L929, entretanto a incorporação do HA diminuiu a absorção celular, provavelmente devido ao elevado peso molecular do ácido hialurônico empregado. O presente estudo permite delinear o futuro desenvolvimento de formulações tópicas para administração de siRNA na córnea.

Palavras-chave: 1. Terapia gênica; 2. *small interference* RNA; 3. Aplicação ocular; 4. Gel *in situ*; 5. Nanopartícula; 6. Cristal líquido

ABSTRACT

ABELHA, T. F. **Development and characterization of topical siRNA drug delivery systems for corneal gene therapy: thermoreversible gel and liquid crystalline nanodispersions.** 2012. 88p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The understanding of human genome and the evolvement of molecular biology led to discovery of important cellular mechanisms. Gene therapy has emerged as an approach to interfere with cell physiology, whenever it has a dysfunction that causes a disease, bringing new possibility of treatment to countless illnesses. In RNA interference mechanism, small double-stranded RNAs (*small interference* RNA, siRNA) inhibit specific gene expression. The eye has been one of the targeted organs for the use of such technology and, moreover, the corneal membrane is an attractive tissue due to the easy access and the existence of several diseases that can impair vision. To enhance bioavailability and facilitate the delivery of siRNA using a cationic polymer, a thermoreversible formulation containing chitosan and a liquid crystalline formulation functionalized hyaluronic acid were studied as potential delivery systems for ocular delivery of siRNA and both this systems are inedited as topical and ocular delivery of siRNA. A poloxamer 407 thermoreversible gel of was associated with two different types of chitosan (LMW with 92.2% deacetylation and MMW with 77.0% deacetylation). Both formulations showed desirable characteristics not only as gene delivery systems due to positive residual charge and capacity for complexing the siRNA, but also as a compatible ocular delivery system, due to pseudoplastic rheological behavior. The LMW chitosan and addition of NaCl to the formulation influenced the $T_{sol/gel}$ of poloxamer gel; only the association with MMW chitosan showed desirable $T_{sol/gel}$. The systems containing poloxamer in combination with two different types of chitosan did not promote *in vitro* penetration of siRNA using bovine cornea under the used experimental conditions. The liquid crystalline system was developed with monoolein (MO), polyethylenimine (PEI), hyaluronic acid (HA) and aqueous phase. The formation of crystalline phases was observed by polarized light microscopy and the mesophases structures were confirmed by small angle X-ray diffraction. The liquid crystalline system composed of a mixture of hexagonal and cubic phases was dispersed into nanoparticles of suitable size, of approximately 166 nm. The formulations showed desirable characteristics as gene delivery systems, such as suitable zeta potential, ability to complex without degrading the siRNA and were not cytotoxic to fibroblasts L929, moreover, were compatible with the ocular administration due to isotonicity. The dispersion of crystals of MO/PEI was able to transfect L929 cells, however the incorporation of the HA decreased cellular uptake, probably due to high molecular weight hyaluronic acid employed. This study provides an outline for the future development of topical formulations to deliver siRNA to the cornea.

Keywords: 1. Gene therapy; 2. *small interference* RNA; 3. Ocular delivery; 4. *In situ* gel; 5. Nanoparticles; 6. Liquid crystals.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia Gênica

A biologia molecular contribuiu amplamente na área de genética para o conhecimento das funções celulares normais e especialmente dos mecanismos que ocasionam uma doença (SAMARA, 1993; NABEL, 2004). Além disso, o projeto Genoma proporcionou um profundo conhecimento do código genético do ser humano, assim como de seus patógenos (HESS; DOUGHERTY, 1997).

As diversas técnicas desenvolvidas no século passado, como a tecnologia de DNA recombinante e o sequenciamento de DNA permitiram, no final da década de 1980, utilizar genes com o propósito terapêutico (GLODE, 1984). A terapia gênica consiste em promover efeito terapêutico pela introdução de uma nova informação genética em células/tecidos para compensar uma função anormal (EMERY, 2004). Inicialmente, a terapia gênica surgiu com a intenção de transferir uma molécula de DNA a ser traduzida em uma proteína específica e desejada. Entretanto, devido ao interesse em inibir a expressão de genes específicos, o uso de moléculas de RNA com esta atividade também foi proposta (GLODE, 1984). Assim, genes específicos podem ser reparados, regulados ou substituídos em um organismo (SAMARA, 1993).

Os genes possuem muitas vantagens com relação aos fármacos convencionais, pois podem ser direcionados a tecidos específicos, reduzindo efeitos secundários, exercem ação por um período prolongado e corrigem a causa do problema ao invés de suprimir sintomas. Além disso, a utilização dessa tecnologia não é restrita e pode ser utilizada para tratar doenças congênitas e adquiridas (LEDLEY; LEDLEY, 1998; BORRÁS, 2003; MOHAN et al., 2005).

A terapia gênica permite controlar a expressão de genes de forma a suprir ou inibir proteínas específicas. As proteínas possuem um papel fisiológico importante para o funcionamento adequado do organismo (NABEL, 2004). A **Figura 1** ilustra alguns mecanismos pelos quais a síntese proteica pode ser controlada em organismos eucariotos (ALBERTS et al., 2010).

Figura 1 – Seis passos nos quais a expressão gênica eucariótica pode ser controlada. Fonte: Adaptado de Alberts *et al.*, 2010.

Conceitualmente, a terapia gênica é bastante simples, mas transformar essa ideia em prática clínica tem provado ser mais difícil do que primeiramente suposto (NABEL, 2004). Dentre as principais técnicas para administrar genes o uso de vetores virais é o método mais utilizado, devido à capacidade natural dos vírus penetrarem na célula e depositarem o material genético. Entretanto, métodos não virais também têm sido propostos como nova alternativa devido a problemas de segurança envolvidos na manipulação e administração de vírus (MHASHILKAR *et al.*, 2001; GRIMM; KAY, 2007). A principal dificuldade em transformar a terapia gênica de pesquisa básica para a prática clínica está justamente na necessidade de se desenvolver um sistema de liberação seguro e eficaz (GRIMM; KAY, 2007).

A tecnologia continua a evoluir conforme a ciência atinge novas conquistas. Assim, com o passar dos anos, o número de protocolos aprovados para estudo clínico na área de terapia gênica tem aumentado consideravelmente e, espera-se que daqui a alguns anos a terapia gênica se torne uma nova classe terapêutica disponível para a prescrição médica (HESS; DOUGHERTY, 1997; MHASHILKAR *et al.*, 2001; NABEL, 2004; GRIMM; KAY, 2007; ALIABADI *et al.*, 2012).

1.2. Interferência de RNA

O RNA ou ácido ribonucleico, um polímero composto por unidades de nucleotídeos, é tradicionalmente considerado um carreador da informação genética. Somente no início da década de 1980 descobriu-se que o RNA não possui somente

uma atividade passiva na transmissão da informação genética, mas que também poderia ter a função de uma enzima (JOYCE, 1989; GARFIELD, 1990). Em 1989 Sidney Altman e Thomas R. Cech dividiram o mérito do prêmio Nobel em química pela descoberta da atividade catalítica de algumas moléculas de RNA (GARFIELD, 1990; CASTANOTTO; ROSSI, 2009). A atuação do RNA tanto no fenótipo quanto no genótipo de um organismo foi possivelmente conservada durante a evolução devido à catálise promovida por RNAs ser um processo altamente eficiente quando moléculas de RNAs são substratos da reação (CECH; BASSI, 1986; JOYCE, 1989; GARFIELD, 1990). Além do início de uma nova área a ser explorada pela ciência, esta descoberta também trouxe uma ampla perspectiva de aplicações, tanto na engenharia genética de plantas agrícolas, quanto no tratamento de doenças hereditárias ou virais (GARFIELD, 1990).

Além da descoberta da atividade catalítica do RNA, estudos sobre a manipulação da expressão de genes, realizados no final do século 20, conduziram ao conhecimento atual de importantes atividades exercidas por moléculas de RNA. O silenciamento genético desencadeado pela introdução de genes foi evidenciado em um estudo envolvendo a coloração de flores de petúnia, realizado por Napoli, Lemieux e Jorgensen em 1990. Os pesquisadores tinham por objetivo aumentar a pigmentação de pétalas da flor, pela introdução de um gene que controla a formação de pigmento. Entretanto, o gene introduzido proporcionou efeito oposto ao esperado e bloqueou a síntese do pigmento, resultando em flores de coloração branca. Também se observou que o nível de RNA mensageiro (mRNA) produzido pelo gene introduzido era 50 vezes menor nas plantas geneticamente modificadas do que nas plantas com fenótipo selvagem. Os mecanismos que explicassem os efeitos observados não eram claros na época, mas a este conjunto de efeitos foi dado o nome de cosupressão (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; REISCHL; ZIMMER, 2009; DAS et al., 2011).

Na mesma época a tecnologia *antisense* começou a ser amplamente estudada por representar um novo tipo de abordagem à forma de regular a expressão de genes. Nesta técnica, um oligonucleotídeo com uma sequência complementar à de ácidos nucleicos específicos (RNA ou DNA) é utilizado para inibir a síntese proteica e, de forma geral, uma elevada concentração da cadeia do ácido nucleico complementar (*antisense*) é necessária para uma ação efetiva (BAERTSCHI, 1994). Estudos realizados sobre o silenciamento genético

desencadeado por oligonucleotídeos *antisense* (IZANT; WEINTRAUB, 1984), assim como sobre a interferência na expressão de genes no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1991; GUO; KEMPHUE, 1995), serviram como inspiração para o trabalho de Fire, Mello e colaboradores alguns anos mais tarde.

Em 1998, eles investigaram algumas características que moléculas de RNA deveriam possuir para interferir na função de genes. Além de investigarem a atividade de RNAs de fita simples, utilizados na tecnologia *antisense*, eles também avaliaram a atividade de moléculas de RNA de fita dupla (dsRNAs – *double stranded* RNAs). Genes relacionados à função motora de *Caenorhabditis elegans* foram o alvo do estudo e os pesquisadores descobriram que dsRNAs foram mais eficientes em bloquear a síntese de proteína do que cada fita isoladamente. Os dsRNAs demonstraram, em uma menor dosagem, efeito potente e mais específico do que cada fita sozinha (FIRE et al., 1998). A partir desse momento, mais uma função foi adicionada ao repertório de atividades atribuídas ao RNA e o termo interferência de RNA (RNAi) passou a ser utilizado (CASTANOTTO; ROSSI, 2009). Em 2006, Andrew Z. Fire e Craig C. Mello receberam o prêmio Nobel em fisiologia ou medicina pela descoberta da potente atividade de dsRNAs em suprimirem a expressão de genes (REISCHL; ZIMMER, 2009). Esta descoberta pôde explicar alguns resultados obtidos em experimentos anteriores, como o evento de cosupressão observado em flores de petúnia. Além disso, a aplicação de RNAi trouxe uma nova possibilidade de avaliar a função de diversos genes, mas principalmente, tornou-se um novo agente terapêutico em potencial (AIGNER, 2006).

A terapia baseada em moléculas de RNA pode ser classificada de acordo com o modo de ação dessas moléculas. Moléculas de RNA enzimaticamente ativas são denominadas ribozimas; moléculas de RNA que se ligam a proteínas ou outros ligantes são denominados *aptamers*; moléculas de fita simples que inibem a tradução de mRNA fazem parte tecnologia *antisense* e as que possuem dupla fita efetuam uma atividade RNA interferente (BURNETT; ROSSI, 2012; KAPOOR; BURGESS; SIDDHESH, 2012).

A descoberta que genes podem ter sua expressão modulada através do mecanismo de RNAi foi o início de um novo paradigma de como lidar com uma ampla diversidade de doenças. Considerando que, teoricamente, qualquer gene pode ter a sua expressão bloqueada, o silenciamento genético desencadeado por

RNAi torna-se uma classe terapêutica atrativa por possuir elevada potência e especificidade (GRIMM; KAY, 2007).

O silenciamento genético desencadeado por RNAs de fita dupla é um mecanismo regulatório fundamental de praticamente todas as células eucariotas e é estimulado como mecanismo de defesa na presença de genes virais (MEISTER et al., 2004; AIGNER, 2006; WOLTERS; MacKEIGAN, 2008). O processo de silenciamento genético é denominado RNA interferente quando moléculas de RNAs são substratos de dsRNAs, que as interceptam devido à presença de alta complementaridade de bases (MEISTER et al., 2004). Inicialmente, havia um consenso de que o mecanismo de RNAi ocorreria somente a nível pós transcricional, mas atualmente estudos indicam que esses pequenos fragmentos de RNA também podem interferir no processo de tradução do material genético (ZARATIEGUI; MARTIENSSEN, 2012).

O silenciamento genético em nível pós transcricional é regulado por dois mecanismos diferentes. Um deles é efetuado por micro RNA (miRNA), denominado repressão translacional, em que o pareamento incompleto leva a interrupção da tradução. No segundo mecanismo, efetuado por *small interference* RNA (siRNA) ou *short hairpin* RNA (shRNA), a molécula de RNA é perfeitamente ou quase perfeitamente complementar ao mRNA alvo, provocando a degradação do mesmo (De PAULA, BENTLEY; MAHATO, 2007; BURNETT; ROSSI, 2012). Primeiramente, atribuiu-se essa atividade às longas moléculas de dsRNA, mas atualmente sabe-se que estas são precursoras de espécies menores muito reativas (WOLTERS; MacKEIGAN, 2008). O mecanismo de RNAi é ativado por moléculas endógenas como o miRNA, mas também por RNAs exógenos sintéticos como o siRNA ou de origem viral como shRNA, o qual é degradado em pequenos fragmentos que imitam o silenciamento genético endógeno (**Figura 2**) (De PAULA, BENTLEY; MAHATO, 2007). Os siRNAs são pequenas moléculas de dsRNA, contendo 20-30 pares de bases, que inibem a tradução de um mRNA específico, impedindo a síntese de proteínas (WOLTERS; MacKEIGAN, 2008; PEER; LIEBERMAN, 2011; ZHOU et al., 2012).

Figura 2 - Mecanismo de Interferência de RNA (RNAi). O processo de RNAi consiste de um passo inicial, no qual dsRNAs são clivados em fragmentos menores representados pelo miRNA ou siRNAs, e um passo efetor, no qual essas moléculas são incorporadas no complexo proteico RISC e usados como sequências-guia para reconhecer RNAm homólogos, os quais são subsequentemente inativados ou clivados. Adaptado de De Paula, Bentley e Mahato (2007).

A introdução de siRNAs no citoplasma das células ativa o mecanismo evolutivo conservado de catalise específica de RNAm, pois se ligam e ativam o complexo de proteínas denominado *RNA-induced silencing complex* (RISC) (MEISTER et al., 2004; PEER; LIEBERMAN, 2011). Os componentes imprescindíveis neste complexo são a proteína de processamento Dicer e a proteína Argonata 2, que confere capacidade de ruptura do RNAm ao complexo (MEISTER et al., 2004). O RISC remove uma das duplas fitas do siRNA e a fita *antisense* remanescente guia o complexo para se ligar ao RNAm de fita simples que possua código genético completar (MEISTER et al., 2004; WOLTERS; MacKEIGAN, 2008; PEER; LIEBERMAN, 2011; ZHOU et al., 2012). Quando o RNAm alvo é encontrado, o complexo enzimático provoca hidrólise e degradação da molécula, inibindo a tradução do gene específico (**Figura 2**). Diferentemente da terapia *antisense*, que possui uma relação estequiométrica ao mRNA alvo, os siRNA são constantemente

recicladados após exercerem a ação, portanto a fita guia do siRNA é conservada e pode ser utilizada repetidamente para novas reações catalíticas (GUO P., et al., 2010; PEER; LIEBERMAN, 2011; BURNETT; ROSSI, 2012).

1.3. Córnea: estrutura e fisiologia

O globo ocular é revestido por três camadas de tecidos diferentes. A mais externa é formada por tecidos conjuntivos com função protetora, nomeados córnea e esclera. A esclera é um tecido opaco, visível na região anterior do globo ocular como a “parte branca do olho”, e a córnea é um tecido transparente localizado na região mais externa do bulbo ocular (LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001). A camada intermediária ou vascular é composta tanto pela coróide e íris, que são tecidos pigmentados que evitam o reflexo da luz, quanto pelo corpo ciliar que é responsável pela produção de humor aquoso. A última e mais interna, denominada retina, é rica em terminações nervosas e fotorreceptores com função sensorial (**Figura 3A**) (LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001).

A córnea é um tecido avascular, exposto diretamente ao meio externo, com função de refratar a luz e proteger contra agentes externos (LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001; KLAUSNER et al., 2007). É uma barreira de 500-700 µm de espessura composta por cinco regiões distintas: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (**Figura 3B**) (LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001; KLAUSNER et al., 2007). O epitélio lipofílico possui espessura de 50 µm e é constituído por cinco ou seis camadas de células não queratinizadas de rápida replicação e autorregenerativas, sendo completamente substituídas num período de cinco a sete dias (KLAUSNER et al., 2007). Essas células são fortemente aderidas umas às outras e à camada de Bowman por desmossomos (LEE, 1992). A camada de Bowman é acelular composta de fibras de colágeno e proteoglicanas com 12 µm de espessura (KLAUSNER et al., 2007). O estroma hidrofílico representa aproximadamente 90% da espessura da córnea (450 µm) e é composto por uma matriz extracelular de colágeno e mucopolissacarídeos que são sintetizados, mantidos e reparados por queratinócitos (LEE, 1992; KLAUSNER et al., 2007). A membrana de Descemet possui espessura variável com a idade (3 µm em recém nascidos a 8-10 µm em adultos) e é composta por colágeno e glicoproteínas

sintetizados e excretados pelo endotélio (LEE, 1992). O endotélio é uma camada única de células com formato poligonal unidas por *tight junctions* (*maculae occludentes*) com 5 μm de espessura (LEE, 1992; JOYCE, 2003). Essas células não se multiplicam ou regeneram após o nascimento e o único mecanismo de reparo é a migração celular ou aumento do tamanho das mesmas (LEE, 1992; LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001; JOYCE, 2003; KLAUSNER et al., 2007).

Figura 3 – A: Composição esquemática do olho. **B:** Organização celular da córnea. Fonte: Adaptado de Klausner et al., 2007.

A hidratação e estrutura definida da córnea que garantem a transparência característica e imprescindível desse tecido para permitir a transmitância da luz incidente (KLAUSNER et al., 2007). A orientação, distribuição e organização precisa das fibras de colágeno do estroma é essencial para a manutenção da transparência do tecido (LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001). Como a córnea é avascular, o endotélio exerce a função fundamental de regular a hidratação do estroma e permitir a entrada de nutrientes do humor aquoso. Há difusão de fluído do endotélio para o epitélio por diferença de osmolalidade, permitindo a hidratação do estroma e nutrição de todo tecido (LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001; JOYCE, 2003). A perda excessiva, baixa densidade ou disfunção das células endoteliais, decorrente de doenças genéticas, traumas físicos ou o envelhecimento, pode prejudicar a acuidade visual (LEE, 1992; JOYCE, 2003; KLAUSNER et al., 2007; QAZI, 2010).

A córnea está protegida por abrasões de partículas, traumas e ação de patógenos pelo sistema lacrimal e pálpebras. A lágrima produzida proporciona o volume permanente de aproximadamente 7-10 μL na superfície ocular (BAEYENS; GURNY, 1997; LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001; WEI et al., 2002; GAFFNEY

et al., 2010; HAO et al., 2010). O filme lacrimal possui uma pequena camada lipídica externa composta de ácidos graxos e esteróis que estão liquefeitos a 35°C (SMOLIN; THOFT, 1987). Abaixo, há uma camada aquosa eletrolítica rica em solutos, oxigênio, proteínas e enzimas. Entre a camada aquosa e a superfície da córnea e conjuntiva há uma camada hidrofóbica de muco, secretado por células da conjuntiva, responsável por manter a estabilidade do filme lacrimal (SMOLIN; THOFT, 1987; KLAUSNER et al., 2007). O pH lacrimal varia conforme sexo, idade, horário, presença de patologia e dependendo do tempo que as pálpebras permanecem fechadas, mas de forma geral considera-se que o pH normal é de 6,5-7,6 (COLES; JAROS, 1984; SMOLIN; THOFT, 1987). A osmolalidade da lágrima também é muito variável e tende a se tornar mais hipertônica ao longo do dia. Valores de osmolaridade de 295,7-308,3 mOsm/L já foram descritos, enquanto que a osmolalidade média de 318 mOsm/Kg foi mensurada em voluntários saudáveis (SMOLIN; THOFT, 1987).

A superfície interior das pálpebras é recoberta pela membrana conjuntiva associada com muco. O reflexo de piscar distribui a lágrima pela córnea e conjuntiva, mantendo-os umedecidos, e o excesso de lágrima é coletado pelo duto e saco lacrimal e excretado via o duto nasolacrimal (**Figura 4**). A córnea, as pálpebras e o sistema lacrimal são responsáveis por prover a proteção imunológica ao olho (SMOLIN; THOFT, 1987; LLOYD; FARAGHER; DENYER, 2001; KLAUSNER et al., 2007). O olho não tolera uma resposta imunológica convencional, pois isso prejudicaria a anatomia necessária para permitir a visão. Portanto, apresenta um sistema imunológico especial, considerado privilegiado pela somatória de vários fatores, incluindo a ausência de drenagem linfática, incapacidade de migração celular à região e presença de fatores imunossupressivos. Com isso a resposta imune ocular ocorre sem ocasionar um processo inflamatório tradicional (BORRÁS, 2003; KLAUSNER et al., 2007).

Figura 4 – A: Visão transversal da distribuição da lágrima. **B:** Esquema representando a drenagem lacrimal. Fonte: Adaptado de Gafney, 2010.

1.4. Terapia Gênica da Córnea

O conhecimento da biologia molecular e os avanços na elucidação da expressão de genes em tecidos particulares tornaram possível o desenvolvimento da terapia gênica. A identificação de genes e mecanismos envolvidos na progressão de doenças trouxe maior conhecimento sobre as doenças oculares e levou ao desenvolvimento de melhores agentes terapêuticos (BORRÁS, 2003; RUTTUM; REIS; SEMINA, 2006). A aplicação de genes exógenos ao olho permite tratar doenças oculares utilizando genes com função terapêutica. A terapia gênica ocular tornou-se atrativa devido ao fácil acesso ao órgão, ao sistema imune privilegiado e, no caso da córnea, devido à possibilidade de tratamento *ex vivo* por poder ser mantida em cultura por tempo prolongado (BORRÁS, 2003; MOHAN et al., 2005).

A aplicação de genes possibilita modificar a fisiologia das células e melhorar o prognóstico de uma doença. Considerando que muitas doenças oculares são crônicas e progressivas a terapia gênica oferece uma nova possibilidade de tratamento (BORRÁS, 2003). Como comentado anteriormente, a transparência da córnea é imprescindível para a visão, e traumas ou infecções podem provocar a perda da acuidade visual (MOHAN et al., 2005). Os principais fatores que comprometem a transparência da córnea são a presença de processo inflamatório

prolongado, edema, neovascularização e/ou desenvolvimento de cicatrizes. Especificamente, a terapia gênica da córnea tem sido proposta para tratar casos de rejeição a transplantes, neovascularização e infecções virais, bem como doenças genéticas, como as distrofias da córnea (MOHAN et al., 2005; KLAUSNER et al., 2007; HAO et al., 2010).

A aplicação da terapia gênica em casos de transplante de córnea tem sido indicada em razão das córneas de doadores poderem ser armazenadas por até um mês, permitindo monitorar e tratar o tecido *in vitro*. Também porque, após as córneas serem dissecadas, o acesso ao endotélio se torna fácil. De todas as camadas da córnea, o endotélio é a mais crítica para a manutenção da transparência e para evitar a rejeição do tecido, aspectos que garantem sucesso após o transplante (BORRÁS, 2003). A rejeição ao transplante de córnea se dá principalmente por uma resposta imunológica que destrói o endotélio (MOHAN et al., 2005; KLAUSNER et al., 2007) e muitas córneas disponíveis em bancos de olhos são rejeitadas por possuírem um número inaceitável de células endoteliais (THANH et al., 2002).

Todas as camadas da córnea podem ser alvos da terapia gênica quando há perda da transparência do tecido (BORRÁS, 2003). A presença de uma patologia pode ser originada de um processo inflamatório e/ou de cicatrização. Em um processo de cicatrização, os queratócitos presentes no estroma produzem exacerbadamente novas fibras de colágeno que causam a opacidade ao tecido. Já na presença de um processo inflamatório, pode ocorrer o surgimento de neovasos, que também é uma condição anormal, uma vez que a córnea é um tecido avascular. A neovascularização pode ocorrer em qualquer camada do tecido, levando a perda da transparência do mesmo (MOHAN et al., 2005; KLAUSNER et al., 2007).

As doenças genéticas da córnea são, adicionalmente, alvo da terapia gênica ocular. De acordo com Gordon (2009), as distrofias da córnea são doenças hereditárias não inflamatórias, divididas em três categorias, dependendo da localização anatômica: I) distrofias anteriores da córnea (epitélio, camada de Bowman e região apical do estroma); II) distrofias do estroma da córnea; III) distrofias posteriores da córnea (membrana de Descemet e endotélio). Todas se manifestam em ambos os olhos, deixando o tecido opaco, resultando em déficit visual de diferentes graus. Um exemplo de distrofia anterior da córnea é a distrofia gelatinosa em forma de gota (**Figura 5**) que causa elevada fotofobia,

lacrimejamento, sensação de incomodo pela presença de corpo estranho e perda severa e progressiva da visão. É causada por depósito de nódulos subepiteliais que se manifestam na primeira ou segunda década da vida (GORDON, 2009).

Figura 5 – Distrofia gelatinosa em forma de gota, uma distrofia genética anterior da córnea. Ilustra a córnea completamente opaca pela presença de nódulos em forma de gota. Alguns vasos sanguíneos estão presentes no tecido opaco. Fonte: Gordon, 2009.

O maior desafio da terapia gênica da córnea é conseguir administrar os genes às células alvo e manter a função dos mesmos (MOHAN et al., 2005). A administração via um carreador viral é comumente estudada devido à capacidade intrínseca dos vírus penetrarem as células. Apesar de possuir menor eficiência de transfecção, a administração não viral por métodos físicos ou químicos tem sido desenvolvida para contornar problemas de segurança com os vetores virais (WANG et al., 2010; HAO et al., 2010; THAKUR et al., 2012). Como o epitélio é uma barreira de difícil penetração, métodos mecânicos, físicos ou cirúrgicos, têm sido propostos, mas uma forma de administração não invasiva e de fácil aplicação é mais conveniente e tolerante (HAO et al., 2010). Além disso, para tornar essa tecnologia uma terapia viável para um amplo número de pacientes, um sistema de liberação que permita ação eficaz e segura precisa ser desenvolvido (MOHAN et al., 2005). Para administrar genes por métodos químicos, moléculas são utilizadas como carreadoras de ácidos nucleicos, podendo ser polímeros catiônicos ou moléculas

ligantes a receptores, como anticorpos (WANG et al., 2010; ALIABADI et al., 2012). Assim, o uso de moléculas carreadoras num sistema de liberação tópico é uma estratégia desafiante, que pode revolucionar o tratamento de diversas enfermidades e permitir o uso clínico da tecnologia de RNAi.

A aplicação da tecnologia de RNAi na terapia gênica ocular vem crescendo nos últimos anos. O uso desta tecnologia para tratamento da degeneração macular já aparece em alguns medicamentos de uso oftálmico em estudo clínico, como por exemplo, o Sirna-027, da *Sirna Therapeutics* e RTP-80li, da *Atugen* (Fase I); e o Cand5, da *Acuity Pharmaceuticals* (Fase II) (AKHTAR; BENTER, 2007). Thakur e colaboradores (2012) relataram seis diferentes medicamentos para uso oftálmico de siRNA em estudo clínico, sendo que somente o produto SYL040012 da *Sylentis* (Fase I) é de aplicação tópica para tratamento do glaucoma e da pressão intraocular. Os demais produtos, das empresas *Pfizer*, *Allergan*, *OpkoHealth* e *Quark Pharmaceuticals*, são aplicados via injeção intravítrea para tratamento de doenças da região posterior do olho.

1.5. Sistemas de liberação ocular para veicular RNAi

A utilização de ácidos nucleicos como agentes terapêuticos tem atraído a atenção de pesquisadores e de indústrias farmacêuticas, que têm investido quantias substanciais no desenvolvimento de terapias baseadas em siRNA. Entretanto, os ácidos nucleicos são moléculas grandes, com elevada carga negativa e muito facilmente degradadas, dificultando o desenvolvimento de sistemas de liberação eficazes (BHATIA; CHAKRABORTY; KRISHNAN, 2012). Apesar de existirem resultados satisfatórios de liberação de siRNA em estudos *in vitro*, um sistema de liberação eficiente *in vivo* representa o maior desafio a ser superado (ROSSI, 2005; ALIABADI et al., 2012). Idealmente, um sistema de liberação deve ser capaz de complexar o siRNA de forma reversível (para garantir a liberação do mesmo dentro da célula), deve proteger o siRNA contra a degradação enzimática tanto durante o tempo de ação do produto, quanto durante a permanência no endossoma, além de não ser tóxico nem imunogênico (ROSSI, 2005).

Sistemas de liberação que visam a administração local de siRNA são vantajosos em tecidos de localização externa, como globo ocular. A administração

local é viável para o desenvolvimento de terapias não invasivas e que requerem a aplicação pelo próprio paciente (BURNETT; ROSSI, 2012). Assim, a administração tópica ocular é o método mais conveniente de veiculação de genes (KLAUSNER et al., 2007). Entretanto, para uma molécula efetuar ação é necessário que ela supere barreiras anatômicas naturais. Os ácidos nucleicos na forma livre não penetram nas células da córnea e, após a aplicação, eles são retidos por todos os tecidos superficiais do globo ocular. Além disso, os ácidos nucleicos possuem baixa estabilidade em fluidos biológicos (FATTAL; BOCHOT, 2006).

Para desenvolver uma formulação oftálmica com siRNA algumas características precisam ser exploradas. As moléculas de RNA são instáveis *in vivo*, devido à presença de inúmeras ribonucleases presentes tanto no soro quanto nas células (BURNETT; ROSSI, 2012). Além da rápida degradação em meio fisiológico, a absorção celular de siRNA é baixa, a liberação da molécula para dentro do citoplasma é ineficiente e não há direcionamento para células específicas. Portanto, é muito importante associar o siRNA aos sistemas de liberação para aumentar a estabilidade, a absorção celular e o direcionamento às células e tecidos específicos (SHEN et al., 2011).

Considerando que o siRNA e a membrana celular são carregados negativamente, uma molécula com residual de carga positiva é comumente usada como um carreador de siRNA. A carga positiva da formulação é importante para formar um complexo com o siRNA, a fim de protegê-lo da degradação enzimática e para facilitar a sua captação celular (MEADE; DOWDY, 2007). A absorção celular do siRNA ocorre por mecanismo vesicular, assim, os sistemas de liberação são utilizados para aumentar o acúmulo das moléculas de siRNA na célula e facilitar a liberação desses agentes dos endossomos para o citosol. Muitos dos vetores sintéticos estudados para viabilizar a ação dessas moléculas são lipídeos, lipossomos, peptídeos e polímeros catiônicos (AKHTAR; BENTER, 2007; MEADE; DOWDY, 2007; TAMURA; OISHI; NAGASAKI, 2010).

Os complexos formados pela associação de um material genético a uma molécula catiônica é denominado poliplexo. Os poliplexos se formam espontaneamente como resultado das interações eletrostáticas entre os grupos positivamente carregados do cátion e os grupamentos negativamente carregados presentes no grupamento fosfato do ácido nucleico. Como resultado há a condensação do gene, proteção contra a degradação enzimática e um sistema de

liberação mais eficiente para a entrada na célula (KABANOV; SRIADIBHATLA; ALAKHOV, 2005). O sucesso dos poliplexos em promover a absorção e liberação do siRNA no citoplasma da célula dependerá da natureza supramolecular dos complexos formados entre a formulação e o siRNA (ALIABADI et al., 2012).

1.5.1. Gel termorreversível com quitosana

Com relação à administração tópica ocular, de forma geral, após a aplicação de um colírio convencional a dose máxima absorvida pela córnea é de 5 % (JÄRVINEN et al., 1995), pois o olho possui muitos mecanismos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos para evitar a entrada de substâncias externas (NANJAWADE et al., 2007). O fluxo lacrimal e o reflexo de piscar causam a drenagem da formulação, resultando em curto tempo de residência e, assim, reduzindo o efeito terapêutico desejado. Para aumentar a eficácia do produto é necessário o uso de uma formulação que aumente a biodisponibilidade e o tempo de contato com a superfície ocular, reduzindo necessidade de aplicações repetitivas do produto (EDSMAN; CARLFORS; PETTERSON 1998).

Os sistemas na forma de géis são retidos por maior período na via ocular do que os colírios convencionais, além de melhor tolerados do que as pomadas. Entretanto, uma formulação na forma de gel pode ser de difícil aplicação pelo paciente, assim como uma pomada. Portanto, soluções de geleificação *in situ* são interessantes, uma vez que são convenientemente gotejados como uma preparação líquida no saco conjuntival, onde passam por uma transição em gel de acordo com o tempo de permanência favorável. A transição ocorre como resultado de mudança química/física induzida pelo ambiente fisiológico (**Figura 6**) (EDSMAN; CARLFORS; PETTERSON, 1998).

Para melhorar o tempo de contato do produto, formulações termorreversíveis com poloxamer são comumente utilizadas. O poloxamer é um copolímero não tóxico em tri-bloco de poli (óxido de etileno) / poli (óxido de propileno) / poli (óxido de etileno) de característica anfifílica, capaz de formar gel *in situ*. Uma solução aquosa de poloxamer, a baixa temperatura, torna-se um hidrogel a uma temperatura mais elevada (DUMORTIER et al., 2006; NIU et al., 2009). A transição de solução para a gel pode ser induzida pelo aumento da temperatura, concentração de polímero e

presença de aditivos na formulação (VIEGAS; HENRY, 1998; BENTLEY et al., 1999; EDSMAN; CARLFORS; PETTERSON, 1998). Conforme a temperatura aumenta, as moléculas do poloxamer se agregam formando micelas. A formação de micelas é atribuída à desidratação da região hidrofóbica, composta pelo óxido de propileno, e consiste no primeiro passo para a formação do gel. Em amostras com uma concentração suficiente do polímero, a formação do gel ocorre devido ao arranjo organizacional das micelas (**Figura 7**) (DUMORTIER et al., 2006). Além da formação de gel *in situ*, o poloxamer tem sido estudado para a administração de genes devido ao seu caráter anfifílico proporcionar a desestabilização da membrana celular (LIAW; CHANG; HSIAO, 2001; KABANOV; SRIADIBHATLA; ALAKHOV, 2005).

Figura 6 – Ilustração do comportamento de um produto termorreversível de uso oftálmico. O produto é aplicado na forma de solução a temperatura ambiente e, ao entrar em contato com a superfície ocular, o aumento da temperatura causa a formação do gel.

Figura 7 – O poloxamer 407 é composto por 95-105 unidades de óxido de etileno (*a*) e por 54-60 unidades de óxido de propileno (*b*). Com o aumento da concentração ([P]) e/ou da temperatura (T^a) a solução de poloxamer se organiza em micelas, que formam uma estrutura ordenada na forma de gel.

O poloxamer 407, classificado como um tensoativo não iônico termorreversível, tem sido utilizado no desenvolvimento de formulações tópicas termorreversíveis para aplicação ocular (LIN; SUNG, 2000; WEI et al., 2002; QI et al., 2007; GRATIERI et al., 2010). Os sistemas de liberação *in situ* contendo este tipo de poloxamer proporcionaram maior tempo de residência após aplicação oftálmica *in vivo* (WEI et al., 2002; GRATIERI et al., 2010). Estudos com poloxamer 407 tiveram resultados reológicos favoráveis para o uso desse polímero em sistemas liberação (RICCI et al., 2002; EDSMAN CARLFORS; PETTERSON, 1998; GRATIERI et al., 2010) e a associação com a quitosana proporcionou características desejáveis para utilização oftálmica, como o aumento da mucoadesão da formulação (GRATIERI et al., 2010).

A quitosana, um polímero biocompatível mucoadesivo de caráter catiônico (LEHR et al., 1992; FELT et al., 1999), vem sendo utilizada como carreador de genes para tratamento muitas doenças, principalmente como um nanocarreador para administração pulmonar (NIELSEN et al., 2010; GHOSN et al., 2010; MAO et al., 2010; RUDZINSKI; AMINABHAVI, 2010), mas também existem propostas promissoras de nanopartículas de uso oftálmico para aplicação de genes na córnea (FUENTE et al., 2008a; FUENTE et al., 2008b).

A quitosana é obtida a partir da quitina pela reação de desacetilação. Cada unidade desacetilada da quitosana possui um grupo amina com pKa de 6,5 (PILLAI et al., 2009; MAO et al., 2010) (**Figura 8**). O grau de desacetilação é um fator importante a ser considerado quando do uso deste polímero na administração de genes, pois um menor grau de desacetilação pode ocasionar baixos níveis de expressão do gene. Isto é explicado pela influência do número de aminas primárias disponíveis para a ligação e, conseqüentemente, a densidade de carga positiva da molécula de quitosana (KIANG et al., 2004). Um alto grau de desacetilação aumenta a carga positiva permitindo maior interação com siRNA e, em nanopartículas, o peso molecular também pode influenciar o tipo de arranjo formado com o siRNA (KIANG et al., 2004; RUDZINSKI; AMINABHAVI, 2010; MAO et al., 2010).

Figura 8 – A quitina é um polímero de N-acetilglicosamina, que após sofrer reação de desacetilação parcial produz a quitosana, composta pela glicosamina e N-acetilglicosamina. Durante a reação de desacetilação os grupamentos acetamido da quitina são transformados, em graus variados, nos grupos amina da quitosana.

Devido às características intrínsecas do poloxamer e da quitosana, ambos foram associados para o desenvolvimento de um sistema de liberação termorreversível, com o intuito de administrar o siRNA de forma tópica na córnea.

1.5.2. Sistema líquido cristalino em associação com ácido hialurônico

Outra proposta de sistema de liberação interessante para uso oftálmico são as formulações de fase líquido cristalina, já que sistemas com estrutura controlável, em escala nanométrica e com elevada estabilidade podem ser obtidos (YAGHMUR; GLATTER, 2009; GUO, C. et al., 2010). Dispersões aquosas nanoestruturadas de cristais líquidos possuem amplo potencial de utilização, pois são compostas de lipídeos biodegradáveis e podem carrear grande quantidade de princípios ativos com diferentes propriedades. Cristais líquidos podem ser dispersos utilizando estabilizadores (tensoativos), que viabilizam utilizar excesso de água na formulação. Portanto, trata-se de uma estratégia promissora para garantir sistemas de liberação eficazes com boa biodisponibilidade e segurança (YAGHMUR; GLATTER, 2009).

Sistemas de liberação ocular compostos por nanopartículas têm sido propostos como a melhor alternativa para a aplicação tópica, devido às propriedades de controle de liberação e tamanho reduzido característicos desse sistema (SAHHO; DILNAWAZ; KRISHNAKUMAR, 2008). Partículas de tamanho pequeno aumentam a biodisponibilidade devido a maior área de contato, sendo que também são capazes

de prolongar a liberação do fármaco (MODDARESI et al., 2010). Além disso, a formulação pode conter substâncias promotoras de absorção, o que facilitaria sua entrada nas células (SAHHO; DILNAWAZ; KRISHNAKUMAR, 2008). Assim, o uso de nanopartículas no desenvolvimento de sistemas de liberação para a terapia gênica é importante, pois permite condensar o gene utilizado, que é uma estrutura com elevado peso molecular (CAI; CONLEY; NAASH, 2008).

Dentre os sistemas de liberação em escala nanométrica, os cristais líquidos são uma estratégia interessante. De forma simplificada, os cristais líquidos são estruturas supramoleculares que apresentam ordem estrutural no estado líquido (SHANKS; STASZCZYK, 2012). Eles são fases da matéria demonstrada por compostos orgânicos anfifílicos, que exibem uma fase de transição entre o estado sólido e o líquido, denominada mesofase. Eles possuem simetria, ordem, mobilidade e propriedades mecânicas intermediárias entre os estados sólido e líquido, ou seja, possuem estrutura organizada como no estado sólido, e também fluidez e mobilidade característicos do estado líquido (HO et al., 1996; SINGH, 2000; LOCKWOOD; GUPTA; ABBOTT, 2008). Os cristais líquidos alteram a orientação ou a formação de fases de acordo com as condições ambientais (pH, temperatura, presença de íons, etc.), portanto apresentam propriedades ideais para a fisiologia de organismos vivos. Lipídeos da membrana plasmática, DNA cromossomal e diversas proteínas funcionais apresentam comportamento de mesofase (HO et al., 1996). Nesse contexto, o uso de cristais líquidos como sistema de liberação pode mimetizar condições biológicas naturais.

Os cristais líquidos são comumente classificados de acordo com a maneira que se dá a formação da estrutura cristalina. Os que são formados pelo aumento da temperatura e fusão de um material são denominados termotrópicos. Já os que são formados pela adição de solventes são classificados como liotrópicos (SINGH, 2000; HIDE, 2001; SHANKS; STASZCZYK, 2012).

Cristais líquidos liotrópicos são compostos por pelo menos uma molécula orgânica e um solvente. A molécula orgânica deve possuir alguma complexidade para não ser simplesmente dissolvida pelo solvente adicionado e comprometer a formação de fases cristalinas. As moléculas anfifílicas são um exemplo de moléculas orgânicas capazes de formarem fases líquido cristalinas. A adição de um solvente, como a água, promove a hidratação seletiva da molécula, evitando a região lipofílica (HIDE, 2001). As cadeias apolares, repelidas pela água polar, tendem a induzir a

formação de agregados hidrofóbicos, enquanto que as cadeias hidrofílicas permanecem expostas ao meio aquoso. Os canais de água formados dependem da composição da fase aquosa e do lipídeo utilizado (YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004).

Um material que apresenta cristalinidade no estado líquido possui aspecto opaco e turvo a olho nu, por outro lado, quando observado ao microscópio de luz polarizada, apresenta texturas óticas características formadas devido à elevada birrefringência (SHANKS; STASZCZYK, 2012). Um cristal é óticamente isotrópico se a fase formada possui uma organização espacial cúbica e apresenta anisotropia quando há uma distribuição espacial em diferentes orientações, que não a cúbica (HIDE, 2001).

Os cristais líquidos liotrópicos podem apresentar diferentes estruturas cristalinas que se organizam de forma a proporcionar mesofases lamelares, cúbicas ou hexagonais (GUO, C. et al., 2010; LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011). A fase lamelar constitui a forma de organização mais simples (**Figura 9**), que apresenta estrutura unidimensional paralela, na forma de bicamadas lipídicas intercaladas por fases aquosas. Os grupamentos polares das moléculas encontram-se adjacentes e projetados para a interface aquosa, enquanto as caudas hidrocarbonadas encontram-se dispostas paralelamente. Essa fase é caracterizada por sua fluidez e anisotropia, sendo visualizada no microscópio de luz polarizada como cruzes malteses isoladas ou cordões finos que representam bicamadas (TYLE, 1989; SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001; MÜLLER-GOYMANN, 2004).

As mesofases hexagonais são geralmente formadas por lipídeos polares e uma fase aquosa, em que o lipídeo absorve certa quantidade de água e espontaneamente forma uma fase de gel com estruturas internas únicas em que princípios ativos podem ser incorporados (**Figura 9**) (GUO, C. et al., 2010; LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011). A fase líquido cristalina hexagonal reversa consiste em uma variedade de canais de água que são separados por bicamadas lipídicas, formando uma matriz hexagonal bidimensional, que é óticamente birrefringente quando observada sob luz polarizada (YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004).

Em uma estrutura líquido cristalina de fase cúbica, as bicamadas lipídicas estão rearranjadas em uma matriz tridimensional na forma de cubos. A fase reversa bicontínua cúbica consiste em dois canais de água contínuos, que não se interceptam e são separados por uma bicamada lipídica (**Figura 9**) (ENGSTRÖM;

ENGSTRÖM, 1992; YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004; PHAN et al., 2011). Um produto composto de mesofase cúbica possui aspecto de um gel viscoso, que é estável com a variação de temperatura, e é opticamente isotrópico (HELLEDI; SCHUBERT, 2001; YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004). As estruturas mesomórficas cúbicas possuem inúmeras aplicações, entretanto, devido à dificuldade de processar e manipular um produto na forma de gel, as dispersões em menores estruturas facilitam a utilização do produto e mantêm as propriedades líquido cristalinas. Portanto, os géis de forma cúbica preparados com excesso de água podem ser dispersos em nanopartículas estáveis (YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004).

Figura 9 – Esquema representando as mesofases reversa bicontínua cúbica (V_2), hexagonal (H_2) e lamelar (L_α) exibidas pela monoleína. Adaptado de: Seddon (2010) e Phan et al. (2011).

A dispersão de sistemas coloidais é comumente feita utilizando o poloxamer 407 como tensoativo estabilizador. Para processar mesofases cúbicas em nanopartículas o método mais comum é a dispersão empregando elevada energia. Nos sistemas com monoleína, os ingredientes são misturados e deixados em repouso por 24 horas. O gel de fase cúbica formado é então disperso em partículas nanométricas pela aplicação de energia mecânica ou ultrassônica (YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004).

A monoleína ou monoelato de glicerila (MO) é composta por lipídeos de cadeia longa insolúveis em água. De forma geral, ela contém pelo menos 90 % de ácidos graxos insaturados, como o oleico e linoleico, e 5-6 % de ácidos graxos saturados (ENGSTRÖM; ENGSTRÖM, 1992). A MO é atóxica, biodegradável e biocompatível, pois está sujeita a sofrer um processo de lipólise devido à atividade de diferentes esterases presentes nos tecidos (ENGSTRÖM; ENGSTRÖM, 1992).

Uma característica importante demonstrada pela MO é a propriedade de formar diferentes cristais líquidos dependendo da temperatura e da hidratação da molécula (ENGSTRÖM; ENGSTRÖM, 1992; GAN et al., 2010). Este lipídio anfifílico forma fase líquido cristalina cúbica espontaneamente em contato com a água e permanece em equilíbrio em excesso de água. Já a fase hexagonal reversa é formada a elevada temperatura ou pela presença de um terceiro componente na formulação que participa do arranjo supramolecular (ENGSTRÖM; ENGSTRÖM, 1992; HELLEDI; SCHUBERT, 2001; LOPES et al., 2006).

Devido à característica anfifílica, tanto moléculas hidrofílicas, quanto lipofílicas podem ser incorporadas ao sistema contendo MO (HELLEDI; SCHUBERT, 2001). Além disso, ela tem sido utilizada como promotora de absorção de formulações (LOPES et al., 2006; LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007) e um sistema líquido cristalino composto por nanopartículas cúbicas de MO, dispersas e estabilizadas com poloxamer 407 para aplicação oftálmica de dexametasona, apresentou resultados satisfatórios de permeação e retenção ocular (GAN et al., 2010).

A associação da MO com a polietilenimina (PEI), polímero catiônico amplamente utilizado como carreador de ácidos nucleicos, poderia permitir a viabilização da aplicação do siRNA num sistema líquido cristalino. A PEI é um polímero solúvel em água e de elevada carga positiva, devido à presença de grupos amino protonáveis (INTRA; SALEM, 2008; GÜNTER et al., 2011). O polímero possui unidades repetidas do grupamento nitrogenado e, em pH fisiológico, somente um grupo amino é protonado. Quando o polímero é associado a um ácido nucleico o perfil de protonação é alterado, mas ainda assim existem unidades nitrogenadas capazes de se protonarem, portanto o PEI possui elevada capacidade tamponante em ampla faixa de pH (KIRCHEIS; WIGHTMAN; WAGNER, 2001). Além de interagir com o material genético por atração eletrostática, o polímero promove a liberação de ácidos nucleicos do endossoma por um processo denominado esponja de prótons. O escape endossomal ocorre pela acidificação do meio, seguido pelo influxo de íons cloro, que é provocado pela ampla capacidade tamponante do polímero. Com isso há migração de água para dentro do endossoma por diferença de osmolalidade, o que provoca a ruptura do mesmo e liberação do seu conteúdo para o citoplasma, inibindo a degradação do ácido nucleico (KIRCHEIS; WIGHTMAN; WAGNER, 2001; ALIABADI et al., 2012).

A princípio, o uso de moléculas catiônicas foi suficiente para a administração de genes *in vitro*, mas para o uso terapêutico *in vivo* essa abordagem é inespecífica e requer o uso de quantidades potencialmente tóxicas de vetores catiônicos. Ao funcionalizar os vetores com moléculas ligantes a receptores celulares há um direcionamento para células específicas e a quantidade do vetor utilizada é reduzida (MEDINA-KAUWE; XIE; HAMM-ALVAREZ, 2005). Visando o direcionamento para células e/ou tecidos específicos e o aumento da absorção celular, o uso de moléculas que se ligam a receptores celulares é uma excelente estratégia para otimizar a administração de genes (THANH et al., 2002; ROSSI, 2005; ZHANG et al., 2008; DOHMEN et al., 2012).

O ácido hialurônico, uma glicosaminoglicana linear de alto peso molecular e com elevada carga negativa, é encontrado na matriz extracelular e também no interior das células. Várias funções biológicas são atribuídas ao ácido hialurônico, relacionadas à sua conformação estrutural e interação específica com as células (COWMAN; MATSUOKA, 2005). Ele contribui para a organização tridimensional e hidratação da matriz extracelular, influenciando as propriedades físico químicas do local onde as células se encontram. Além disso, através da interação e internalização pela célula, ele pode modular o metabolismo, o crescimento e a migração de fibroblastos. Fibroblastos humanos expressam quantidade considerável do receptor CD44 na membrana plasmática, sendo que ele é, pelo menos parcialmente, utilizado para internalizar e transportar moléculas de ácido hialurônico exógenas para os lisossomos (CROCE et al., 2003).

O ácido hialurônico tem sido estudado como alvo para interação com receptor celular CD44 presente em fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e cancerosas (ISACKE; YARWOOD, 2002; AFIFY et al., 2005; SUZUKI et al., 2002; SHEN et al., 2011). O receptor CD44 foi descrito para as células epiteliais e conjuntivais da córnea humana e uso do ácido hialurônico em uma nanopartícula de aplicação tópica ocular proporcionou alta transfecção celular de DNA (FUENTE et al., 2008a; FUENTE et al., 2008b). A conjugação química de moléculas ligantes de receptores ao PEI tem sido uma estratégia utilizada para veiculação de genes (THANH et al., 2002; JIANG et al., 2008, JIANG et al., 2009). Particularmente, a associação do ácido hialurônico com PEI para vetorização com siRNA atingiu os objetivos do estudo (JIANG et al., 2008, JIANG et al., 2009).

Devido às características positivas como sistema de liberação descritas para os cristais líquidos e às propriedades adequadas dos excipientes relatados, a associação dos mesmos em um sistema de cristal líquido de MO disperso em excesso de água, contendo PEI como carreador de siRNA e ácido hialurônico como promotor da captação celular específica foi desenvolvido. A **Figura 10** sumariza as principais informações relevantes para a escolha da formulação a ser estudada.

Figura 10 – Principais propriedades e estruturas químicas dos excipientes escolhidos para desenvolvimento do sistema líquido cristalino em associação com ácido hialurônico.

5. CONCLUSÕES

O estudo realizado nas condições experimentais descritas permitiu inferir as seguintes conclusões:

- ✓ Dentre os dois tipos de quitosana estudados, somente a associação do poloxamer 407 com a quitosana MMW apresentou $T_{\text{sol/gel}}$ adequada para o desenvolvimento de um sistema de liberação termorreversível. Além disso, as formulações contendo os dois tipos de quitosana apresentaram comportamento pseudoplástico, que é uma característica desejável para um sistema de liberação tópico ocular.
- ✓ A quitosana LMW e a presença de NaCl influenciaram a $T_{\text{sol/gel}}$ do poloxamer, sendo que somente o NaCl alterou as propriedades fluxo e deformação do gel termorreversível, pois a formulação F_{NaCl} apresentou comportamento dilatante.
- ✓ Ambas as quitosanas apresentaram características desejáveis para um sistema de liberação de siRNA, como carga residual positiva e capacidade de complexar o siRNA.
- ✓ As formulações contendo poloxamer em associação com os diferentes tipos de quitosana não foram efetivas como sistemas de liberação para veicular siRNA nas condições avaliadas no estudo de penetração *in vitro* em córnea bovina.
- ✓ A avaliação da osmolalidade do poloxamer 407 demonstrou que o polímero apresenta grande influência na osmolalidade do produto nas concentrações analisadas e o melhor método determinar a sua osmolalidade é a medida direta das amostras, sem a diluição das mesmas.
- ✓ Com relação ao sistema de nanopartículas de cristal líquido observou-se que o tempo de estabilização do gel inicial, antes da dispersão, influenciou a estabilização da formação de fases cristalinas, que não foi alterada pela adição de NaCl à fase aquosa.
- ✓ A incorporação do HA e/ou siRNA proporcionou pequena influência na estrutura líquido cristalina, não provocando alteração de fase, somente pequenas alterações entre as distâncias das cadeias lipofílicas e os canais de água. A adição do HA provocou diminuição do parâmetro de rede da fase hexagonal e cúbica, provavelmente devido à desidratação dos canais de água, por se tratar de uma molécula hidrofílica. A adição do siRNA não alterou o parâmetro de rede da fase hexagonal, sugerindo a adsorção da molécula na superfície das partículas de

mesofase hexagonal. Já o parâmetro de rede da fase cúbica aumentou com a incorporação do siRNA, possivelmente devido a distribuição da molécula no interior da fase cristalina cúbica.

- ✓ A nanodispersão de cristais líquidos apresentou características desejáveis para um produto oftálmico desenvolvido para a terapia gênica. O tamanho médio das partículas, a carga superficial e a osmolalidade do sistema foram satisfatórios. A capacidade das nanopartículas líquido cristalinas em complexar o siRNA sem provocar a sua degradação também foi comprovada e as formulações não apresentaram citotoxicidade na linhagem celular utilizada.
- ✓ As nanodispersões foram capazes de transfectar as células, sendo que a associação com HA utilizado não promoveu maior absorção celular, provavelmente devido ao peso molecular do material empregado.
- ✓ Pequenos aperfeiçoamentos no sistema de liberação líquido cristalino funcionalizado com HA, como a utilização de um material com menor peso molecular, poderia proporcionar resultados favoráveis como sistema de liberação oftálmico de siRNA mediado pelo receptor celular CD44.
- ✓ O estudo das formulações proporcionou resultados que permitem fazer um delineamento para o aperfeiçoamento e desenvolvimento de futuras formulações tópicas para administração de siRNA na córnea. Foi possível demonstrar que a escolha do tipo de formulação e dos excipientes utilizados no desenvolvimento de um produto é de grande relevância. A influência do tipo de excipiente utilizado foi observada tanto para a quitosana presente na formulação termorreversível, quanto para HA associado à dispersão de cristais líquidos.
- ✓ Comparando-se os sistemas de gel termorreversível e a nanodispersão de cristais líquidos, o sistema cristalino nanoestruturado é uma estratégia mais promissora para a administração de siRNA.

6. REFERÊNCIAS

AFIFY, A. M. et al. Expression of hyaluronic acid and its receptors, CD44s and CD44v6, in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. **Annals of Diagnostic Pathology**, v.9, p. 312–318, 2005.

AEINLENG, N. et al. Physicochemical Performances of Indomethacin in Cholesteryl Cetyl Carbonate Liquid Crystal as a Transdermal Dosage. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 2, 2012.

AIGNER, A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 12–25, 2006.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010. 415 p.

ALIABADI, H. M. et al. Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: Where do we stand? **Biomaterials**, v. 33, p. 2546-2569, 2012.

AKHTAR, S.; BENTER, I. Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 164-182, 2007.

AMAR-YULI, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Solubilization of Nutraceuticals into Reverse Hexagonal Mesophases. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 10171–10180, 2008.

AMAR-YULI, I. et al. Hexosome and Hexagonal Phases Mediated by Hydration and Polymeric Stabilizer. **Langmuir**, v. 23, p. 3637-3645, 2007.

BAERT, B. et al. A New Discriminative Criterion for the Development of Franz Diffusion Tests for Transdermal Pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, n.2, p. 218-230, 2010.

BAERTSCHI, A. J. Antisense oligonucleotide strategies in physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 101, p. R15-R24, 1994.

BAEYENS, V.; GURNY, R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**, v.72, p. 191-202, 1997.

BHATIA, D.; CHAKRABORTY, S.; KRISHNAN, Y. Designer DNA give RNAi more spine. **Nature Nanotechnology**, v. 7, p. 244-346, 2012.

BENTLEY, M. V. L. B. et al. Influence of lecithin on some physical chemical properties of Poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 49-55, 1999.

BORNÉ, J.; NYLANDER, T.; KHAN, A. Phase Behavior and Aggregate Formation for the Aqueous Monoolein System Mixed with Sodium Oleate and Oleic Acid. **Langmuir**, v. 17, n.25, p. 7742–7751, 2001.

BORRÁS, T. Recent developments in ocular gene therapy. **Experimental Eye Research**, v. 76, p. 643–652, 2003.

BURNETT, J. C.; ROSSI, J. J. RNA-Based Therapeutics: Current Progress and Future Prospects. **Chemistry & Biology**, v.19, 2012.

CABOI, F. et al. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein:water system. I. Phase behavior. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.109, p. 47–62, 2001.

CAFFREY, M. Kinetics and Mechanism of Transitions Involving the Lamellar, Cubic, Inverted Hexagonal, and Fluid Isotropic Phases of Hydrated Monoacylglycerides Monitored by Time-Resolved X-ray Diffraction. **Biochemistry**, v. 26, p. 6349-6363 1987.

CAI, X.; CONLEY, S.; NAASH, M. Nanoparticle applications in ocular gene therapy. **Vision Research**, v. 48, p. 319–324, 2008.

CARTIER, R.; RESZKA, R. Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. **Gene Therapy**, v. 9, p. 157–167, 2002.

CASTANOTTO, D.; ROSSI, J. J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. **Nature**, v. 457, p. 426-433, 2009.

CECH, T. R.; BASS, B. L. Biological Catalysis by RNA. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 599-629, 1986.

COWMAN, M. K.; MATSUOKA, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 791–809, 2005.

COLES, W. H.; JAROS, P. A. Dynamics of ocular surface pH. **British Journal of Ophthalmology**, v.68, p. 549-552, 1984.

COOPER, K. J. et al. Prediction of ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 95-103, 2001.

CROCE, M. A. et al. Hyaluronan uptake by adult human skin fibroblasts in vitro. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, n.1, p. 63-74, 2003.

DAS; S. et al. Mechanism of RNA interference (RNAi): Current concept. **International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering**, v. 9, p. 240-245, 2011.

DELLAMARY, L. et al. Assessing and optimizing osmolality of poloxamer 407 hydrogel formulations for sustained inner ear drug delivery. In: NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE, v. 12, n. S1, 2010, San Francisco. San Francisco: **The AAPS Journal**, 2010.

DE PAULA, D; BENTLEY, M. V. L. B.; MAHATO, R. I. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. **RNA**, v.13, p.431-56, 2007.

DOHMEN, C. et al. Defined Folate-PEG-siRNA Conjugates for Receptor-specific Gene Silencing. **Molecular Therapy–Nucleic Acids**, v. 1, p. 1-7, 2012.

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

DUMORTIER, G. et al. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, 2006.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETTERSON, R. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 105-112, 1998.

EMERY, D. W. Gene therapy for genetic diseases: On the horizon. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 411–422, 2004.

ENGSTRÖM, S.; ENGSTRÖM, L. Phase behavior of the lidocaine-monoolein-water system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 79, p. 113-122, 1992.

FARKAS, E. et al. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, n. 2, p. 239–245, 2000.

FATTAL; BOCHOT. Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides aptamer and siRNA. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1203-1223, 2006.

FEIGIN, L. A.; SVERGUN; D. I. **Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering**. New York: Plenum Press, 1987. 3 p.

FELT, O. et al. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 180, p. 185–193, 1999.

FIRE; A. et al. Production of antisenseRNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. **Development** v. 113, p. 503–514, 1991.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-strandedRNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FUENTE, M. et al. Novel Hyaluronic Acid-Chitosan Nanoparticles for Ocular Gene Therapy. **Investigative Ophthalmology & Visual Sciences**, v. 49, n. 5, 2008a.

FUENTE, M. et al. Bioadhesive hyaluronan–chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. **Gene Therapy**, v. 15, p. 668–676, 2008b.

GAFFNEY, E. A. et al. A mass and solute balance model for tear volume and osmolarity in the normal and the dry eye. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 29, p. 59-78, 2010.

GAN, L. et al. Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: Improving precocular retention and ocular bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, p. 179–187, 2010.

GARFIELD, E. The 1989 Nobel Prize in Chemistry goes to Sidney Altman and Thomas R. Cech for the Discovery of Enzymatic RNA. **Essays of an Information Scientist**, v. 13, n. 29, p. 266-273, 1990.

GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small angle X-ray Scattering**. London: Academic Press, 1982. 3 p.

GLODE, L. M. The Molecular Bridge to Gene Therapy. **Urology Symposium**, v. 44, n. 6A, p. 81-88, 1994.

GRATIERI, T. **Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo***. 2010. 190 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

GRATIERI, T. et al. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 186–193, 2010.

GRIMM, D.; KAY, M. A. Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 12, p. 3633-3641, 2007.

GHOSN, B. et al. Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nanocarrier for small interfering RNA. **Oligonucleotides**, v. 20, p. 163-72, 2010.

GORDON, K. K. Corneal dystrophies. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 4, n. 7, p. 1-38, 2009.

GÜNTHER, M. et al. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 438–449, 2011.

GUO, C. et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 23/24, 2010.

GUO, P. et al. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 650-666, 2010.

GUO, S; KEMPHUES, K. J. par-1 a Gene Required for Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser/Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed. **Cell**, v. 61, p. 611-620, 1995.

HÄGERSTRÖM, H. et al. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 301-309, 2000.

HAO, J. et al. Gene delivery to cornea. **Brain Research Bulletin**, v. 81, p. 256–261, 2010.

HELLEDI, L. S.; SCHUBERT, L. Release Kinetics of Acyclovir from a Suspension of Acyclovir Incorporated in a Cubic Phase Delivery System. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.27, n.10, p. 1073–1081, 2001.

HESS, P.; DOUGHERTY, G. J. Gene Therapy Monitoring: Clinical Monitoring for Efficacy and Potential Toxicity. **Molecular Diagnosis**, v. 2, n. 2, p. 147-155, 1997.

HIDE, S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K. **Handbook of applied surface and colloid chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 2001, p. 299-332.

HO, M-W. et al. Organisms as polyphasic liquid crystals. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, p. 81-91, 1996.

ISACKE, C. M.; YARWOOD, H. The hyaluronan receptor, CD44. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 718–721, 2002.

IZANT, G. J.; WEINTRAUB, H. Inhibition of Thymidine Kinase Gene Expression by Anti-Sense RNA: A Molecular Approach to Genetic Analysis. **Cell**, v. 36, p. 1007-1015, 1984.

JÄRVINEN, K. et al. Ocular absorption following topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 3-19, 1995.

JIANG, G. et al. Hyaluronic Acid–Polyethyleneimine Conjugate for Target Specific Intracellular Delivery of siRNA. **Biopolymers**, v. 89, n 7, 2008.

JIANG, G. et al. Target specific intracellular delivery of siRNA/PEI-HA complex by receptor mediated endocytosis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n 3, 2009.

JOYCE, G. F. RNA evolution and the origins of life. **Nature**, v. 338, p. 217-224, 1989.

JOYCE, N. C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 22, p. 359–389, 2003.

INTRA; SALEM. Characterization of the transgene expression generated by branched and linear polyethylenimine-plasmid DNA nanoparticles in vitro and after intraperitoneal injection in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 130, p. 129–138, 2008.

KABANOV, A. V.; SRIADIBHATLA, S.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® Block Copolymers for Nonviral Gene Delivery. In: AMIJI, M. M. **Polymeric Gene Delivery: Principles and Applications**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2005.

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

KIRCHEIS, R.; WIGHTMAN, L.; WAGNER, E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 341–358 2001.

KLAUSNER, E. A. et al. Corneal gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 124, p. 107–133, 2007.

KIANG, T. et al. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. **Biomaterials**, v. 25, p. 5293–5301, 2004.

LEDLEY, F. D.; LEDLEY, T. S. Pharmacokinetic considerations in somatic gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 30, p. 133–150, 1998.

LEE, R. W. **Ophthalmic Histopathology**. London: Springer-Verlag, 1992. 287-311 p.

LEHR, C. M. et al. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of Chitosan and some other natural polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 78, p. 43-48, 1992.

LELONG, I. H.; REBEL, G. pH drift of “physiological buffers” and culture media used for cell incubation during in vitro studies. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 39, p. 203-210, 1998.

LIAW, J.; CHANG, S-F.; HSIAO F-C. In vivo gene delivery into ocular tissues by eye drops of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) polymeric micelles. **Gene therapy**, v. 8, p. 999-1004, 2001.

LIBSTER, D. et al. An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporine A: Physical characterization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 308, p. 514-524, 2007.

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, p. 375–386, 2011.

LIN, H-R.; SUNG, K. C. Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 379-388, 2000.

LLOYD, A. W.; FARAGHER, R. G. A.; DENYER, S. P. Ocular biomaterials and implants. **Biomaterials**, v. 22, p. 769-785, 2001.

LOCKWOOD, N. A.; GUPTA, J. K.; ABBOTT, N. L. Self-assembly of amphiphiles, polymers and proteins at interfaces between thermotropic liquid crystals and aqueous phases. **Surface Science Reports**, v. 63, p. 255–293, 2008.

LOPES, L. B. et al. 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, 2006.

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 Pharmaceutics Sciences**, v. 32, p. 209-215, 2007.

LUO, S. et al. Effect of HEPES buffer on the uptake and transport of P-glycoprotein substrates and large neutral amino acids. **Molecular Pharmacology**, v.7, n. 2, p. 412–420, 2010.

MEADE; DOWDY. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 134-140, 2007.

MEDINA-KAUWE, L. K.; XIE, J.; HAMM-ALVAREZ, S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. **Gene Therapy**, v. 12, p.1734–1751, 2005.

MAO, S. et al. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 12-27, 2010.

MEISTER, G. et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. **Molecular Cell**, v. 15, p. 185-197, 2004.

MHASHILKAR, A. et al. Gene therapy Therapeutic approaches and implications. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 279–297, 2001.

MODDARESI, M. et al. The role of vehicle–nanoparticle interactions in topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, p. 176–182, 2010.

MOHAN, R. R. et al. Gene therapy in the cornea. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 24, p. 537–559, 2005.

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.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, n. 2, p.343-356, 2004.

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

NANJAWADE, B. K. et al. In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 122, p. 119-134, 2007.

NAGARWAL, R. C. et al. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 136, p. 2–13, 2009.

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, p. 279-289, 1990.

NEGRETE, A.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. Effect of Pluronic F-68, 5% CO₂ Atmosphere, HEPES, and Antibiotic-Antimycotic on Suspension Adapted 293 Cells. **The Open Biotechnology Journal**, v. 2, p. 229-234, 2008.

NIELSEN, E. J. B. et al. Howard, Pulmonary Gene Silencing in Transgenic EGFP Mice Using Aerosolised Chitosan/siRNA Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, p. 1-8, 2010.

NIU, G. et al. Synthesis and characterization of reactive poloxamer 407s for biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 138, p. 49-56, 2009.

PEER, D.; LIEBERMAN, J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. **Gene Therapy**, p. 1-7, 2011.

PHAN, S. et al. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, p. 176-182, 2011.

PILLAI, C. K. S. et al. Chitin and Chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641-678, 2009.

QAZI, Y. et al. Corneal transparency: Genesis, maintenance and dysfunction. **Brain Research Bulletin**, v. 8, p. 198–210, 2010.

QI, H. et al. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, p. 178-187, 2007.

REICHL, S.; BEDNARZ, J.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. **British Journal of Ophthalmology**, v. 88, p.560-565, 2004

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

RICCI, E. J. et al. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 17, p.161–167, 2002.

ROJANASAKUL, Y.; ROBINSON, J. R. The cytoskeleton of the cornea and its role in tight junction permeability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 68, p.135-149 1991.

ROSSETTI, F. C. et al. 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, n. 7, 2011.

ROSSI, J.J. Receptor-targeted siRNA. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 682-684, 2005.

RUDZINSKI, W. E.; AMINABHAVI, T. M. Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA. **European Journal of Pharmaceutics**, v. 399, p. 1-11, 2010.

RUTTUM, M. S.; REIS, L. M.; SEMINA, E. V. Application of Genetic Approaches to Ocular Disease. **Pediatric Clinics of North America**, v. 53, p. 751–765, 2006.

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

SAHHO, S. K.; DILNAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3 e 4, p. 144-151, 2008.

SAMARA, G. et al. Molecular Biology and Therapy of Disease. **The American Journal of Surgery**, v. 165, 1993.

SHANKS, R. A.; STASZCZYK, D. Thermal and Optical Characterization of Polymer-Dispersed Liquid Crystals. **International Journal of Polymer Science**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

SHEN, Y. et al. 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, p. 233–243, 2011.

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

SCHERLIESS, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 98-105, 2011.

SEDDON, A. Bridging the gap between *in vitro* and *in vivo* models. **Bristol Centre for Functional Nanomaterials**. Disponível em <<http://www.portal.bcf.n.bris.ac.uk>>. 2010.

SHIMOKAWA, K-I. et al. Rheological properties of reversible thermo-setting in situ gelling solutions with the methylcellulose–polyethylene glycol–citric acid ternary system (2): Effects of various water-soluble polymers and salts on the gelling temperature. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, p. 56–58, 2009.

SMOLIN, G.; THOFT, R. A. **The cornea: Scientific Foundations and Clinical Practice**. Boston: Little, Brown and Company, 2 ed., 1987, p. 38-49.

SUZUKI, M. et al. CD44 stimulation by fragmented hyaluronic acid induces upregulation and tyrosine phosphorylation of c-Met receptor protein in human chondrosarcoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1591, p. 37–44, 2002.

TAETZ, S. et al. The influence of chitosan content in cationic chitosan/PLGA nanoparticles on the delivery efficiency of antisense 20-O-methyl-RNA directed against telomerase in lung cancer cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 358–369, 2009.

TAKEUCHI, M. et al. Rheological properties of reversible thermo-setting in situ gelling solutions with the methylcellulose–polyethylene glycol–citric acid ternary system. **Colloid and Polymer Science**, v. 281, p. 1178-1183, 2003.

TAMURA, A.; OISHI, M.; NAGASAKI, Y. Efficient siRNA delivery based on PEGylated and partially quaternized polyamine nonogels: Enhanced gene silencing activity by the cooperative effect of tertiary and quaternary amino groups in the core. **Journal of Controlled Release**, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.05.031, 2010.

TEGTMEYER, S.; PAPANTONIOU, I.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 51, p.119-125, 2001.

THANH, H. N. et al. Transferrin-Polyethylenimine Conjugate, FuGENE6 and TransIT-LT as Nonviral Vectors for Gene Transfer to the Corneal Endothelium. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 46, 140–146, 2002.

THAKUR, A. et al. Strategies for ocular siRNA delivery: Potential and limitations of non-viral nanocarriers. **Journal of Biological Engineering**, v. 6, n. 7, 2012.

THE JAPANESE PHARMACOPOEIA 15TH EDITION (JP XV). Osmolarity Determination. Disponível em <<http://jpdb.nihs.go.jp/jp15e/>>. Acesso em 20 de maio de 2011.

UBELS, J. L. et al. Corneal permeability in a redesigned corneal holder for the bovine cornea opacity and permeability assay. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 853–857, 2004.

TYLE, P. Liquid Crystals 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.

WANG, J. et al. Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 4, 2010.

WEI, G. et al. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 65-74, 2002.

WIRANOWSKA, M. et al. Modulation of hyaluronan production by CD44 positive glioma cells. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 532–542, 2010.

WOLTERS, N. M.; MacKEIGAN, J. P. From sequence to function: using RNAi to elucidate mechanisms of human disease. **Cell Death and Differentiation**, v.15, p. 809–819, 2008.

XIONG, X.-B. ULUDAG, H.; LAVASANIFAR, A. Biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polyesters with grafted polyamines as supramolecular nanocarriers for efficient siRNA delivery. **Biomaterials**, v. 30, p. 242–253, 2009.

VALLS, R. et al. Transcorneal Permeation in a Corneal Device of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Drug Delivery Systems. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 2, 66-71, 2008.

Van den BERGHE, C.; GUILLET, M. C.; COMPAN, D. Performance of porcine corneal opacity and permeability assay to predict eye irritation for water-soluble cosmetic ingredients. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 823–830, 2005.

VIEGAS, T.; HENRY, R. L. Osmotic behavior of poloxamer 407 and other non-ionic surfactants in aqueous solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 160, p. 157–162, 1998.

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.

YANG, D.; ARMITAGE, B.; MARDER, S. R. Cubic Liquid-Crystalline Nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 4402–4409, 2004.

YONG, C. S. et al. Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of Poloxamer gels containing diclofenac sodium. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 195-205, 2001.

ZARATIEGUI, M.; MARTIENSSEN, R. The persistence of a silent memory. **Nature Genetics**, v. 44, n. 2, p. 118-119, 2012.

ZHANG, K. et al. Receptor-mediated delivery of siRNAs by tethered nucleic acid base-paired interactions. **RNA**, v.14, p. 577-583, 2008.

ZHANG, Y. et al. Efficient siRNA Delivery Using a Polyamidoamine Dendrimer with a Modified Pentaerythritol Core. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 1627–1636, 2012.

ZHAO, Z. et al. Use of Poloxamers for deswelling of Organ-Cultured Corneas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, p. 550-559, 2008.

ZHOU, J. et al. Deep Sequencing Analyses of DsiRNAs Reveal the Influence of 3' Terminal Overhangs on Dicing Polarity, Strand Selectivity, and RNA Editing of siRNAs. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 1, p. 1-16, 2012.