UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Nanopartículas de fase líquido cristalina hexagonal funcionalizadas com peptídeos de transdução para veiculação de siRNA na terapia de doenças tópicas

Raquel Petrilli

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Nanopartículas de fase líquido cristalina hexagonal funcionalizadas com peptídeos de transdução para veiculação de siRNA na terapia de doenças tópicas

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: Raquel Petrilli

Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 08/03/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Ribeirão Preto
2013

PETRILLI, R.	**Nanopartículas de fase líquido cristalina hexagonal funcionalizadas com peptídeos de transdução para veiculação de siRNA na terapia de doenças tópicas**		MESTRADO FCFRP-USP 2013

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.

Petrilli, Raquel
Nanopartículas de fase líquido cristalina hexagonal funcionalizadas com peptídeos de transdução para veiculação de siRNA na terapia de doenças tópicas. Ribeirão Preto, 2013.
99 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. Cristais líquidos. 2. siRNA. 3. Doenças tópicas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raquel Petrilli
Nanopartículas de fase líquido cristalina hexagonal funcionalizadas com peptídeos de transdução para veiculação de siRNA na terapia de doenças tópicas.

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.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Ao meu irmão Nando, fonte de inspiração para que eu seguisse a carreira acadêmica, modelo de força e coragem.

Ao meu pai, pelo esforço em prover meus estudos e com isso proporcionar que este momento fosse possível.

A minha mãe, pelo carinho e companheirismo durante todos esses anos e por sempre apoiar meus estudos.

Ao meu namorado Josi, futuro marido, pelo amor, carinho e companheirismo, além da imensa contribuição científica. Obrigada por sempre me apoiar nos meus caminhos e escolhas, me ajudando a escolher os caminhos da felicidade e do sucesso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar e iluminar os meus caminhos.

Aos meus pais, irmãos e a minha sobrinha pelo companheirismo e compreensão durante as minhas ausências.

A minha sobrinha Yasmin pela presença alegre e pelo carinho.

Aos amigos do laboratório pela convivência diária, alegre e descontraída.

A Profa. Maria Vitória pelos ensinamentos, orientação e discussões deste trabalho.

Aos professores Sérgio Akira Uyemura, Maria José Vieira Fonseca, Márcia Fantini e Simone Kashima Haddad pelas discussões e estrutura fornecida para a realização de alguns experimentos.

Aos técnicos do laboratório de farmacotécnica, José Orestes, Henrique e Fabíola, pelo auxílio em experimentos.

A Fapesp pelo apoio deste projeto com bolsa de mestrado.

RESUMO

PETRILLI, R. **Nanopartículas de fase líquido cristalina hexagonal funcionalizadas com peptídeos de transdução para veiculação de siRNA na terapia de doenças tópicas.** 2013. 99f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O processo de interferência de RNA refere-se ao silenciamento pós transcricional seqüência-específico de genes em animais e plantas capaz de ser promovido por dsRNA homólogo à seqüência do gene silenciado. Este processo pode ser aplicado como terapia, que apresenta como vantagens a especificidade pelos alvos escolhidos, a possibilidade de tratar uma enorme gama de doenças genéticas, além do fato de ser muito potente e eficaz. Contudo, o principal desafio consiste em manter a estabilidade dos siRNAs nos fluidos biológicos, visto que estes são bastante susceptíveis à excreção renal e a degradação por RNAses. Com isso, reforça-se a necessidade de sistemas de liberação adequados, que sejam capazes de manter a estabilidade dos siRNAs por tempo suficiente para que atinjam os órgãos alvo da terapia e promover sua liberação sustentada. De particular interesse são determinadas proteínas e peptídeos de transdução (PTDs) que podem ser ligados a fármacos hidrofílicos e assim tornam possível com que estes atravessem membranas. Neste sentido, muitos sistemas carreadores não-virais tem sido estudados para a veiculação de siRNA, sendo de cunho inovador o desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados baseados em cristais líquidos funcionalizados com peptídeos de transdução de membrana para a veiculação tópica de siRNAs. Desta forma, nanopartículas de cristais líquidos de fase hexagonal contendo ou não os aditivos catiônicos polietileimina (PEI) e oleilamina (OAM) foram funcionalizadas com peptídeos de transdução de membranas TAT (TAT) ou penetratin (PNT). Os sistemas obtidos foram complexados com siRNA por interação eletrostática e caracterizados através de medidas de tamanho de partícula/ polidispersividade, potencial zeta e eficiência de complexação. A citotoxicidade dos sistemas foi avaliada em fibroblastos L929 pelo ensaio do MTT e por citometria de fluxo e a avaliação da transfecção *in vitro* foi realizada por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência. Os sistemas contendo PEI ou OAM apresentavam potencial zeta positivo e foram capazes de complexar o siRNA adicionado na concentração de 10 µM. Os estudos em culturas celulares demonstraram que os sistemas contendo ácido oleico (AO) foram mais eficientes quanto à transfecção em células de fibroblastos L929 e esta eficiência de transfecção foi aumentada com a funcionalização com o peptídeo TAT. A partir daí, os sistemas selecionados foram avaliados quanto a penetração cutânea *in vivo*. Os sistemas nanodispersos formados por MO/AO/PEI proporcionaram uma maior liberação de siRNA na pele e a eficiência de supressão de TNF-alfa em modelo animal de inflamação cutânea foram maiores que formulações controle. Com isso, demonstrou-se que os sistemas desenvolvidos são promissores para a futura aplicação na terapia gênica tópica de doenças cutâneas inflamatórias.

Palavras-chave: siRNA, nanodispersões líquido cristalinas, pele, fibroblastos.

ABSTRACT

PETRILLI, R. **Hexagonal phase liquid crystalline nanonoparticles functionalyzed with transduction peptides for siRNA vehiculation in the therapy of topical diseases**. 2013. 99f Dissertation (Master's). College of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The RNA interference process refers to the sequence-specific post-transcriptional silencing of genes in animals and plants capable of being promoted by dsRNA that are homologous to the sequence of the silenced gene. This process can be applied as therapy, which presents advantages such as the specificity to the chosen targets, the possibility to treat a variety of genetic diseases, besides being very potent and efficacious. However, the major hurdle consists in keeping the siRNAs stability in the biological fluids, because they are susceptible to renal clearance and degradation by RNAses. Thus, there is the need for suitable delivery systems, capable of maintaining the stability of siRNAs for sufficient time so they can reach the target organ in the therapy and promote sustained release. Of particular interest are certain proteins and peptides transduction domains (PTDs) that can be connected to hydrophilic drugs and thus make it possible to cross cell membranes. Within this context, many non-viral vectors have been studied for siRNA vehiculation which makes innovative the present study because it aims at the development of nanostructured delivery systems based on liquid crystals functionalyzed with membrane transduction peptides for the topical vehiculation of siRNAs. Thus, hexagonal phase liquid crystal nanoparticles containing or not the cationinc polyethylenimine (PEI) and oleylamine (OAM) were functionalyzed with membrane transduction peptides TAT (TAT) or penetratin (PNT). The obtained systems were complexed with siRNA by eletrostatic interaction and characterized for particle size, polidispersity, zeta potential and complexation efficiency. The cytotoxicity of the formulations was performed with L929 fibroblasts by MTT assay and flow cytometry and the in vitro transfection was evaluated by flow cytometry and fluorescence microscopy. The systems containing PEI or OAM presented positive zeta potential and could complex siRNA at the concentration of 10 µM. The cell culture studies demonstrated that the systems containing oleic acid (OA) were the most efficient to transfect L929 cells and the transfection efficiency was enhanced with the functionalization with the TAT peptide. Thereafter, the selected systems were evaluated for the in vivo skin penetration. The nanosdispersed systems composed of MO/OA/PEI functionalyzed with TAT resulted in a higher siRNA penetration and release in the skin, promoting higher TNF alfa supression in animal model of cutaneous inflammation, compared to the control formulations. Hence, we demonstrated that the developed systems are promising for the treatment of inflammatory skin diseases.

Key-words: siRNA, liquid crystalline nanodispersions, fibroblasts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flor de petúnia com co-supressão sense pelo silenciamento da chalcona sintase (BEAL, 2005) 02

Figura 2. Mecanismo de interferência de RNA. Adaptado de De PAULA *et. al.* (2007b). 04

Figura 3. Modificações químicas para a estabilização de siRNA: a) fosfodiéster; b) fosforotionato RNA; c) 2′-deóxi-RNA; d) 2′-deóxi-2′-fluoro (2′F-) RNA; e) 2′-O-metil (2′-O-Me) RNA (BRUNO, 2011) 08

Figura 4. Ilustração esquemática de diferentes métodos não-virais comumente utilizados para carrear siRNAs (Adaptado de LAM *et. al*., 2012). 09

Figura 5. Ilustração esquemática da endocitose de um lipoplexo contendo siRNA (Adaptado de SCHROEDER *et. al.*, 2009). 10

Figura 6. Estrutura química da OAM utilizada neste trabalho 10

Figura 7. Fórmula estrutural de PEI 25kDa ramificado utilizado neste trabalho 11

Figura 8. Ilustração esquemática da entrada de peptídeos de transdução de membrana na célula (Adaptado de http://www.molmed.uni-luebeck.de) 13

Figura 9. Estrutura química da MO (GANEM-QUINTANAR *et al.*, 2000). 15

Figura 10. Estrutura de diversas fases líquido-cristalinas formadas pelo sistema binário MO:Água. L_α, Fase Lamelar; L2, Fase Micelar Reversa; HII, Fase Hexagonal Reversa; QIIG, Fase Cúbica Giróide; QIID, Fase Cúbica Diamante. Adaptado de GEIL *et. al*. (2000). 16

Figura 11. (A) Estrutura esquemática da pele (BEAR *et al.,*2002) e (B) Destaque para o estrato córneo (Adaptado de http://www.pucrs.br). 18

Figura 12. Resultados de potencial zeta obtidos para as soluções de TAT e PNT contendo siRNA. 39

Figura 13. Resultados das corridas eletroforéticas realizadas para as soluções de PNT e TAT contendo siRNA. 41

Figura 14. Aparência dos cristais líquidos obtidos sob a microscopia de luz polarizada (aumento 32X) antes da dispersão por ultrassom, sendo: A) MO/fase aquosa (10:90, p/p); B) MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p); C) MO/AO/fase aquosa (8:2:90, p/p/p); D) MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p); E) MO/OAM/ fase aquosa (10:1:89, p/p/p) e F) MO/AO/OAM/fase aquosa (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p). 42

Figura 15. Resultados obtidos para tamanho de partícula e polidispersividade das nanodispersões estudadas, sendo (A) ND MO/ fase aquosa (10:90, p/p); (B) MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p); (C) ND MO/OAM/fase aquosa (10:1:89, p/p/p); (D) ND MO/AO/ fase aquosa (8:2:90, p/p/p); (E) ND MO/AO/PEI/ fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p) e (F) ND MO/AO/OAM/ fase aquosa (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p). 44

Figura 16. Resultados obtidos para potencial zeta das nanodispersões estudadas sendo, A) MO/fase aquosa (10:90, p/p); B) MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p); C) MO/AO/fase aquosa (8:2:90, p/p/p); D) MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p); E) MO/OAM/ fase aquosa (10:1:89, p/p/p) e F) MO/AO/OAM/fase aquosa (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p). 46

Figura 17. Resultados obtidos por difração de raios X de baixo ângulo para a ND MO/PEI. 50

Figura 18. Resultados obtidos por difração de raios X de baixo ângulo para a ND MO/OAM. 52

Figura 19. Resultados obtidos por difração de raios X de baixo ângulo para a ND MO/AO/PEI. 54

Figura 20. Resultados obtidos por difração de raios X de baixo ângulo para a ND MO/AO/OAM. 56

Figura 21. Resultados obtidos para as corridas eletroforéticas das nanodispersões compostas por MO/fase aquosa (10:90, p/p), MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p), MO/AO/fase aquosa (8:2:90, p/p/p), MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p) na presença de siRNA (10 μM) e/ou TAT (0,1 mM). 59

Figura 22. Resultados obtidos para as corridas eletroforéticas das nanodispersões compostas por MO/fase aquosa (10:90, p/p), MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p), MO/AO/fase aquosa (8:2:90, p/p/p), MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p) na presença de siRNA (10μM) e PNT em diferentes concentrações (0,01 mM e 0,025 mM). 59

Figura 23. Resultados obtidos para as corridas eletroforéticas das nanodispersões compostas por MO/OAM/ fase aquosa (10:1:89, p/p/p) e MO/AO/OAM/fase aquosa (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p) na presença de siRNA (10μM) e/ou TAT 0,1 mM ou PNT 0,025 mM. 60

Figura 24. Resultados obtidos para a corrida eletroforética na presença de heparina (5000 UI/mL). As bandas representam o siRNA descomplexado para as amostras estudadas. 61

Figura 25. Resultados obtidos para o ensaio de viabilidade celular em células L929 por MTT para as diferentes formulações estudadas com tempo de incubação de 24 h. Aplicação de teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, *p < 0,05 em relação ao controle. Controle utilizado: células cultivadas na ausência de tratamento. 64

Figura 26. Resultados obtidos para o ensaio de viabilidade celular em células L929 por citometria de fluxo para as diferentes formulações estudadas com tempo de incubação de 24 horas. Aplicação de teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, *p < 0,05 em relação ao controle. Controle utilizado: células cultivadas na ausência de tratamento. 66

Figura 27. Resultados obtidos para células positivas para FAM por citometria de fluxo em células L929 para as diferentes formulações estudadas com tempo de incubação de 24 h. Aplicação de teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, *p < 0,05. Controle utilizado: células cultivadas na ausência de tratamento. 68

Figura 28. Visualização das células L929 na ausência de luz fluorescente (esquerda) e quando incubadas com siRNA-FAM e soluções dos PTDs (TAT 0,5 mM e PNT 0,05 mM) por 24 h (direita, ausência total de fluorescência para soluções de siRNA contendo ou não PTDs), aumento de 20 vezes. 69

Figura 29. Visualização dos fibroblastos L929 sob aumento de 20 vezes em microscópio de fluorescência (λexc= 500 nm, λem= 535 nm) em presença de diferentes sistemas contendo siRNA, sendo controle siRNA a solução aquosa contendo siRNA. Todas as preparações contendo siRNA foram obtidas com siRNA-FAM. 70

Figura 30. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência em objetiva de 10 vezes (λexc= 500 nm, λem= 535 nm) para cortes histológicos de pele com espessura de 10 μm. 73

Figura 31. Resultado obtido *in vivo* para as diferentes formulações 76

aplicadas com relação à supressão de TNF-α (Teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney para as amostras comparadas ao controle, $p < 0,05$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais clinical trials em andamento (fase de recrutamento) utilizando terapia com siRNAs (Adaptado de ClinicalTrials.gov). 06

Tabela 2 – Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões do sistema MO/PEI/FA incorporados com TAT 0,1 mM, PNT 0,025 mM e/ou siRNA 10 μM. 51

Tabela 3 – Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões do sistema MO/OAM/FA incorporados com TAT 0,1 mM, PNT 0,025 mM e/ou siRNA 10 μM. 53

Tabela 4 – Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões do sistema MO/AO/PEI/FA incorporados com TAT 0,1 mM, PNT 0,025 mM e/ou siRNA 10 μM. 55

Tabela 5 – Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões do sistema MO/AO/OAM/FA incorporados com TAT 0,1 mM, PNT 0,025 mM e/ou siRNA 10 μM. 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RNAi	RNA de interferência
siRNA	*Small interfering RNA*
RNAm	RNA mensageiro
PEI	Polietilenimina
OAM	Oleilamina
shRNA	*Short hairpin* RNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucléico
PTDs	*Protein transduction domains*
CPPs	*Cell-penetrating peptides*
PNT	Penetratin
MO	Monoleína
AO	Ácido oléico
TAT	HIV-1 TAT protein 47-57
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
PHE	Fenantrolina
NEM	N-etilmaleimida
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
MTT	[Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
siRNA-FAM	siRNA marcado com fluoresceína
siRNA-TNF-α	siRNA pré-desenhado
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncroton
SAXS	Difração de raios X de baixo ângulo
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
DMSO	Dimetilsulfóxido
ND	Nanodispersão

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas vi
Lista de abreviaturas e siglas vii

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 A descoberta: RNA de interferência (RNAi) 2
1.2 O mecanismo de interferência de RNA 3
1.3 Aplicação do mecanismo de RNAi na terapêutica 5
1.4 Desafios e estratégias usadas na veiculação de siRNAs 6
1.4.1 Lipídeos catiônicos 9
1.4.2 Polímeros catiônicos 11
1.4.3 Peptídeos de transdução de membrana 12
1.5 Sistemas de liberação: os cristais líquidos 14
1.6 Via cutânea para siRNA e usos da terapia cutânea com siRNA 18
1.6.1 Psoríase 20

2. OBJETIVOS 21
2.1 Objetivo geral 22
2.2 Objetivos específicos 22

3. MATERIAL E MÉTODOS 23
3.1 Material 24
3.1.1 Solventes, reagentes e matérias-primas 25
3.1.2 Equipamentos e acessórios 26
3.2 Metodologia 26
3.2.1 Obtenção das soluções contendo o peptídeo TAT ou penetratin 26
3.2.2 Obtenção das nanodispersões de cristal líquido 26
3.2.3 Caracterização dos sistemas obtidos 27
3.2.3.1 Análise por microscopia de luz polarizada 27
3.2.3.2 Análise do tamanho e índice de polidispersividade das partículas nas dispersões 28
3.2.3.3 Medida da carga superficial e mobilidade eletroforética das partículas na dispersão 28
3.2.3.4 Difração de raios X de baixo ângulo 29
3.2.4 Avaliação da eficiência de complexação 29
3.2.5 Avaliação da liberação de siRNA dos complexos obtidos 30
3.2.6 Cultura celular 31
3.2.6.1 Avaliação da viabilidade celular 31
3.2.6.2 Avaliação da transfecção em fibroblastos L929 32
3.2.7 Estudos *in vivo* de penetração cutânea 33
3.2.8 Avaliação *in vivo* da eficácia de siRNA pré-desenhado em modelo animal 34
3.2.9 Análise dos dados 36

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 37

4.1 Soluções contendo o peptídeo TAT ou penetratin 38
4.2. Caracterização dos sistemas obtidos 41
4.2.1 Análise por microscopia de luz polarizada 41
4.2.2 Análise do tamanho e índice de polidispersividade das partículas nas dispersões 43
4.2.3 Medida da carga superficial e mobilidade eletroforética das partículas na dispersão 46
4.2.4 Difração de raios X de baixo ângulo 49
4.3 Avaliação da eficiência de complexação 57
4.4 Avaliação da liberação de siRNA dos complexos obtidos 60
4.5 Avaliação da viabilidade celular 62
4.6 Avaliação da transfecção em fibroblastos L929 67
4.7 Estudos in vivo de penetração cutânea 72
4.8 Avaliação in vivo da eficácia de siRNA pré-desenhado em modelo animal . 75

5. CONCLUSÕES 78

6. REFERÊNCIAS 81

7. ANEXOS 98

Introdução

1.1 A descoberta: RNA de interferência (RNAi)

Desde a sua descoberta em 1998 (FIRE et al., 1998; GELEY; MÜLLER, 2004), o RNA de interferência foi disseminado para aplicação em pesquisas em nível celular e molecular. Foi descrito pela primeira vez por Richard Jorgensens e Joseph Mols enquanto tentavam aumentar os níveis de expressão gênica em petúnias. O experimento foi realizado através da introdução de múltiplas cópias de um transgene envolvido na produção de pigmentos, mas ao contrário do que esperavam, foi observado o silenciamento não apenas do transgene, mas também do gene endógeno, tornando as flores totalmente brancas ou irregularmente coloridas (Figura 1), processo que foi denominado de co-supressão (SIFUENTES-ROMERO et al.,2011).

Figura 1. Flor de petúnia com co-supressão sense pelo silenciamento da chalcona sintase (BEAL, 2005)

Enquanto isso, Guo e Kemphues investigavam a função do gene *par-1* em *Caernorhabditis elegans* utilizando para isso uma sequência de RNA antissense para bloquear a produção de proteínas de *par-1*. O resultado obtido foi o mesmo de quando foi utilizada a sequência sense, utilizada como controle negativo. Simultaneamente, Andrew Fire e Craig Mello obtiveram resultados similares em seus estudos, porém em adição ao experimento de Guo e Kemphues, esses

injetaram as duas fitas conjuntamente, o que propiciou a observação de que a injeção de dsRNA foi substancialmente mais efetiva na produção de interferência do que a injeção de cada fita individualmente, sendo este efeito denominado RNA de interferência (RNAi) (SIFUENTES-ROMERO et al., 2011).

Após três anos, Tuschl *et. al.* 2001 publicaram a primeira demonstração de que siRNAs (*small interfering RNA*) sintéticos eram capazes de provocar inibição gênica sequência-específica em determinada linhagem celular de mamíferos, sendo que pouco tempo depois a primeira utilização de siRNAs bem-sucedida foi obtida para a hepatite C em ratos (WHITEHEAD et al., 2009).

A utilização do mecanismo de RNA de interferência representou um grande passo na pesquisa biológica (De FOUGEROLLES et al., 2005) visto que fundamentalmente se apresenta como uma nova maneira de tratar doenças, fazendo com que alvos que antes não eram atingidos pelas terapias convencionais possam ser tratados, revolucionando o entendimento dos mecanismos endógenos da regulação gênica e assim proporcionando ferramentas valiosas para a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos (De FOUGEROLLES et al., 2007).

1.2 O Mecanismo de interferência de RNA

Em suma, o processo de interferência de RNA refere-se ao silenciamento pós transcricional seqüência-específico de genes em animais e plantas capaz de ser promovido por dsRNA que é homólogo a seqüência do gene silenciado (ELBASHIR et al.,2001; LEE; KUMAR, 2009). Assim, os mediadores responsáveis pela degradação do RNAm são os siRNAs, ou seja fragmentos de RNA fita dupla contendo de 21 a 23 nucleotídeos, gerados pela quebra do dsRNA pela ribonuclease III (ELBASHIR et al., 2001; XIE et al., 2006)

As vias de RNAi são conduzidas por pequenos RNAs que incluem os siRNAs e microRNAs (Figura 2). O silenciamento gênico pode ser induzido pela quebra seqüência específica por siRNA com perfeita complementariedade ao RNAm, enquanto que microRNAs medeiam a repressão translacional e transcrevem a degradação para alvos não perfeitamente complementares. Na via endógena, RNAs são processados no núcleo e exportados para o citoplasma na

forma de moléculas precursoras denominadas pré-microRNAs. Este é então clivado e processado pela enzima RNAse III denominada Dicer para produzir microRNAs e siRNAs que se ligam a um complexo multienzimático contendo Argonauta2 (AGO2) e o complexo indutor de silenciamento de RNA (RISC) que promovem o descarte de uma fita, formando um complexo ativo AGO2-RISC capaz de buscar e se ligar ao RNAm que tenha uma seqüência complementar, inativando sua expressão devido à atividade de nuclease de RISC. No caso da complementariedade não ser perfeita, o complexo se liga e bloqueia a translocação; se a complementariedade é perfeita ou quase perfeita, o complexo cliva o RNAm. O silenciamento gênico pela clivagem do RNAm é considerado particularmente eficiente visto que leva à rápida degradação dos fragmentos de RNA e permite ao complexo RISC ativado que busque e destrua outros RNAm alvo (De FOUGEROLLES et al., 2007; KREBS, ALSBERG, 2011).

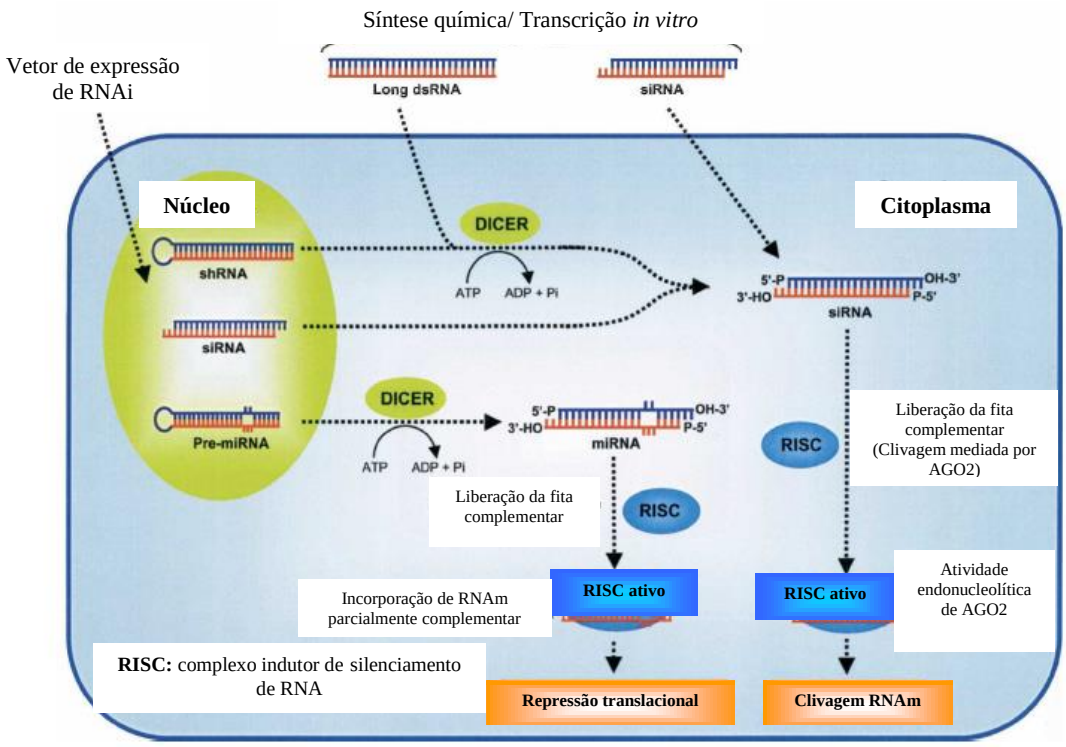

Figura 2: Mecanismo de interferência de RNA. Adaptado de De PAULA et al., (2007b).

Considerando-se que o mecanismo de interferência de RNA é endógeno, muitas funções podem ser atribuídas a ele, tais como a abundância de mecanismos regulatórios gênicos que variam desde o controle epigenético da atividade de um gene, defesas contra o ataque de vírus e até o controle do desenvolvimento. Dada a versatilidade deste mecanismo fica clara sua importância em mecanismos fisiológicos humanos, sendo que a via de RNAi pode contribuir para alterações na expressão gênica e indução de uma infinidade de doenças ainda desconhecidas (GELEY et al., 2004).

1.3 Aplicação do mecanismo de RNAi na terapêutica

O silenciamento gênico induzido por siRNAs se tornou uma importante ferramenta na biologia molecular (SIFUENTES-ROMERO et al., 2011). A promessa da degradação de RNA específica gerou muito entusiasmo devido à possibilidade de utilizar esta modalidade terapêutica visto que muitos siRNAs podem ser desenvolvidos para ter como alvos o silenciamento de oncogenes envolvidos na proliferação, sobrevivência, invasão, angiogênese, metástase, inibição da apoptose de genes que causam resistência a quimioterapia e radioterapia (Ozpolat et al., 2010). Trata-se de uma das mais potentes estratégias terapêuticas para o tratamento de desordens genéticas causadas tanto pelo defeito de um único gene (ex: imunodeficiência severa combinada, pachyonychia congênita) como pelo de múltiplos genes (ex: câncer, inflamação) (KAPOOR et al., 2012).

As principais vantagens deste tipo de terapia consistem na especificidade pelos alvos escolhidos visto que esta é determinada pelas interações entre as bases nucleicas. Ademais, teoricamente todas as doenças associadas a genes podem ser tratadas desta maneira, permitindo o tratamento de doenças que diferem do alelo normal por apenas um ou poucos nucleotídeos. Comparada às estratégias como oligonucleotídeos de DNA e riboenzimas, o RNAi é muito mais potente, o que significa que as moléculas efetoras podem atuar em concentrações muito mais baixas, implicando em melhor eficácia do processo (LARSON et al., 2007; AAGAARD; ROSSI, 2007).

Muitos estudos clínicos em suas diversas fases estão sendo conduzidos por diferentes empresas, aprimorando os conhecimentos nesta área. Através do portal ClinicalTrials.gov é possível identificar 27 estudos clínicos em andamento com siRNA, sendo 15 deles concluídos ou interrompidos (seja fase 1 ou fase 2). Segue abaixo uma tabela que resume os principais clinical trials em andamento (www.ClinicalTrials.gov, acesso em 05/01/2013).

Tabela 1. Principais clinical trials em andamento (fase de recrutamento) utilizando terapia com siRNAs (Adaptado de ClinicalTrials.gov).

Fase	Doença alvo	Rota de administração/ agente carreador	Empresa/ Responsável
I	Adenocarcinoma de pâncreas	siRNA em polímero biodegradável/ local	Silenseed Ltd
II	Hipertensão ocular ou glaucoma	Colírio/ tópico	Sylentis S.A.
I/ II	Função renal deficiente em rins transplantados	Injeção intravenosa	Quark Pharmaceuticals
II	Edema macular diabético	Injeção intravítrea	Quark Pharmaceuticals

1.4 Desafios e estratégias utilizadas na veiculação de siRNAs

O transporte de siRNA a tecidos animais *in vivo* constitui um grande desafio e envolve a utilização de estratégias com modificações físicas, químicas e biológicas ou combinação destas (XIE et al., 2006).

A principal dificuldade refere-se à estabilidade dos oligos de siRNA; seu pequeno tamanho (21 nucleotídeos) torna-os bastante susceptíveis à excreção renal quando administrados na corrente sanguínea, fagocitose, agregação por

proteínas plasmáticas, mesmo quando estas moléculas permanecem estáveis após modificações químicas (XIE et al., 2006; WHITEHEAD et al., 2009; TAMURA et al., 2010.). Em segundo lugar, a fita dupla do siRNA é relativamente instável no plasma, podendo ser degradada pela atividade de nucleases endógenas em um pequeno intervalo de tempo. Além disso, quando administrados sistemicamente sofrem distribuição não-específica, o que é capaz de reduzir significativamente a concentração destes siRNA no alvo. A partir disso, devem ser capazes de transpor a barreira endotelial e as múltiplas barreiras que compõe o tecido até atingir as células alvo sendo, portanto sua utilização prejudicada pela baixa taxa de captação celular ou por endocitose deficiente e baixa biodisponibilidade (XIE et al., 2006; CUN et al., 2010; ZHANG et al., 2006).

Os diferentes tecidos alvos, diferentes rotas necessárias e diversas aplicações farmacológicas possíveis tornam impossível a utilização de um sistema de liberação único que seja aplicável a todas as situações. Para aumentar sua estabilidade no meio extracelular e intracelular, oligos de siRNA podem ser quimicamente modificados por uma variedade de métodos (Figura 3), incluindo mudanças na coluna oligo, substituição individual de nucleotídeos por análogos e adição de conjugados com destaque para o propilenoglicol e conjugados de siRNA com colesterol, sendo que tais modificações químicas resultam em um aumento significativo à resistência à degradação no plasma, aumentando sua estabilidade, sem contudo resolver os problemas da excreção renal acelerada e transporte ao alvo (SOUTSCHEK et al., 2004; XIE et al., 2006; WHITEHEAD et al., 2009).

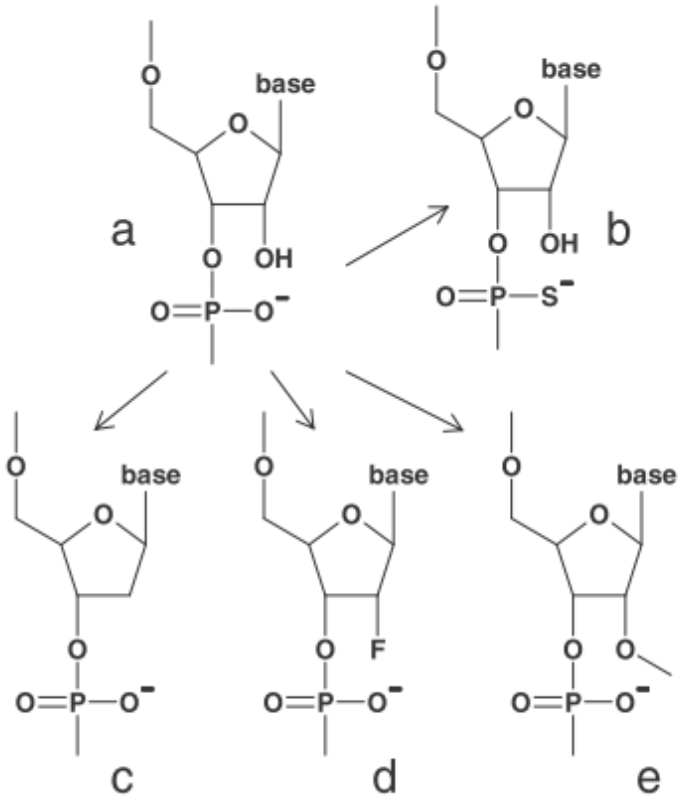

Figura 3. Modificações químicas para a estabilização de siRNA: a) fosfodiéster; b) fosforotionato RNA; c) 2′-deóxi-RNA; d) 2′-deóxi-2′-fluoro (2′F-) RNA; e) 2′-O-metil (2′-O-Me) RNA (BRUNO, 2011)

As moléculas de siRNA sozinhas não são capazes de atravessar as membranas plasmáticas devido ao seu elevado peso molecular (14000Da) e à elevada densidade de carga negativa das cadeias fosfato (AAGAARD; ROSSI, 2007; EGUCHI; DOWDY, 2009; ALIABADI et al., 2012). Com o intuito de carreá-las existem dois principais sistemas: vetores virais e não virais. Os carreadores virais utilizam-se de transfecção de shRNA (*"short hairpin"* RNA), um vetor que induz a produção de siRNA na célula, que embora possua um elevado potencial como transportador, este sistema não é suficientemente seguro devido aos efeitos colaterais já observados (EGUCHI; DOWDY, 2009).

Muitos sistemas carreadores não-virais (Figura 4) têm sido estudados para a veiculação de siRNA (XIE et al., 2006), tais como lipídeos catiônicos (MA et al., 2005; MÉVEL et al., 2010), polímeros catiônicos (TAMURA et al., 2010; GRAYSON et al., 2006), micelas catiônicas (ZHU et al., 2010), peptídeos de transdução de membrana (ZHANG et al., 2006) e nanopartículas (CUN et al., 2010). Neste trabalho exploraremos o potencial de polímeros catiônicos como a polietilenimina

(PEI), lipídeos catiônicos como a oleilamina (OAM), além da funcionalização com peptídeos de transdução de membrana, tais como penetratin e TAT.

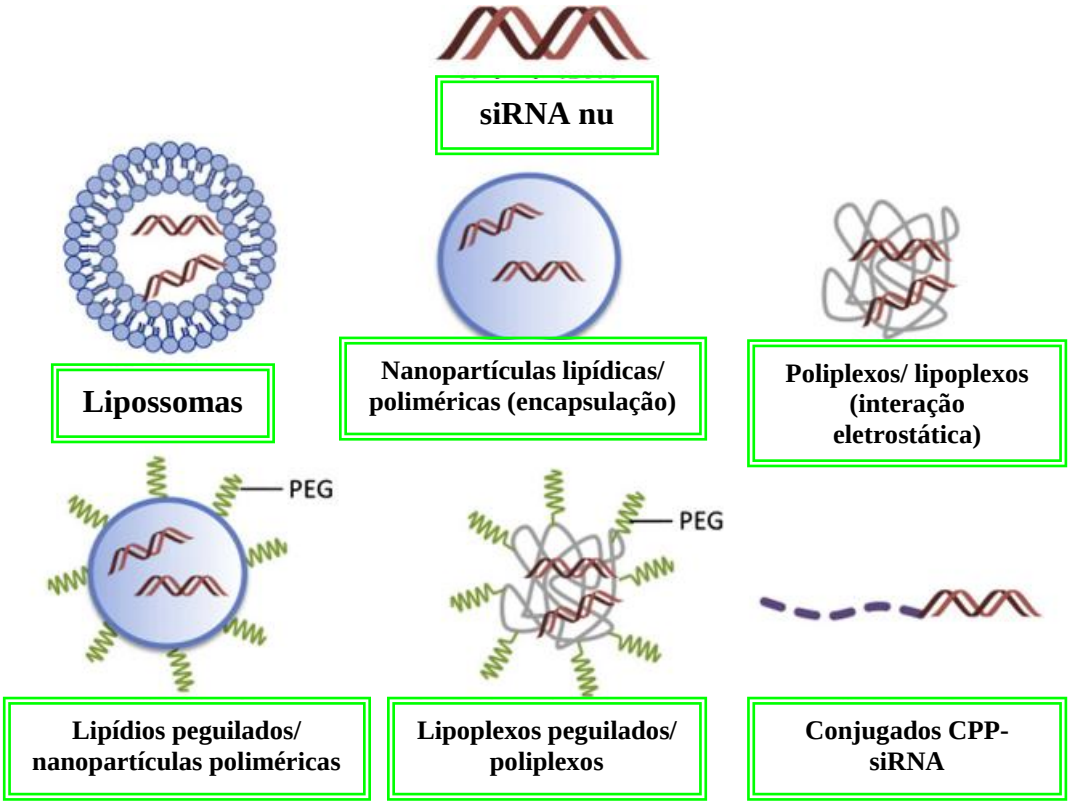

Figura 4. Ilustração esquemática de diferentes métodos não-virais comumente utilizados para carrear siRNAs (Adaptado de LAM et al., 2012).

1.4.1 Lipídeos catiônicos

Os lipídeos catiônicos foram introduzidos como carreadores para DNA e RNA há cerca de 20 anos. Estes são capazes de interagir com ácidos nucléicos carregados negativamente através de interações eletrostáticas capazes de gerar complexos denominados lipoplexos. O mecanismo (Figura 5) atualmente aceito para este sistema de liberação é o de que os ácidos nucléicos interagem com as vesículas lipídicas positivamente carregadas e em seguida, vesículas positivas se adsorvem aos ácidos nucléicos que estão em contato com o solvente, gerando

estruturas multilamelares de bicamadas lipídicas carregadas positivamente (SHOROEDER et al., 2009; WELSMAN et al., 2004).

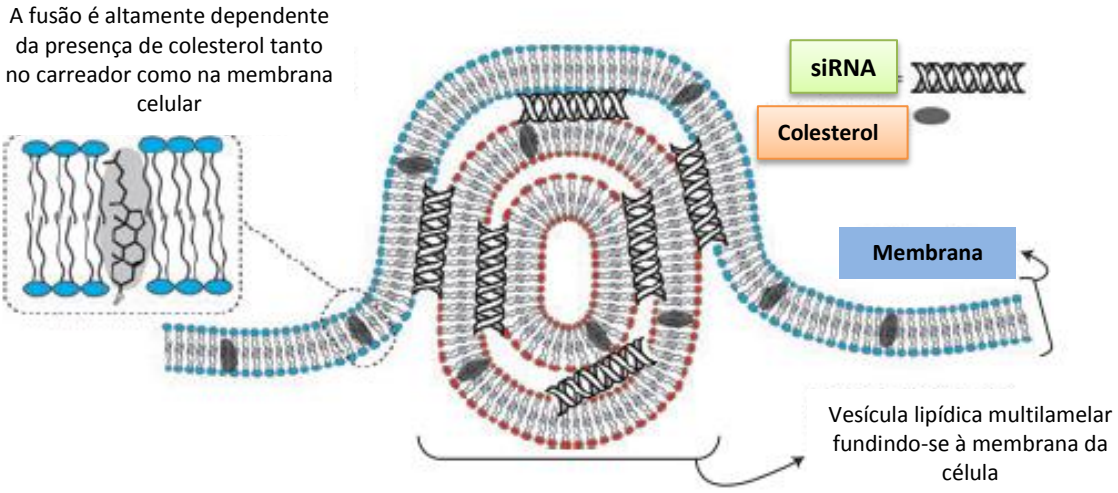

Figura 5. Ilustração esquemática da endocitose de um lipoplexo contendo siRNA (Adaptado de SCHROEDER et al., 2009).

Entre as propriedades dos lipídeos catiônicos que são determinantes para a eficiência de transfecção e citotoxicidade estão o tipo de grupo catiônico conectado à cadeia hidrofóbica e o comprimento desta (SUH et al., 2009). O efeito citotóxico está associado à natureza catiônica dos vetores, o que é determinada principalmente pela estrutura da cadeia hidrofílica. Aminas primárias como a OAM (Figura 6) tendem a ser menos tóxicas do que estruturas contendo amônio quaternário (LV et al., 2006).

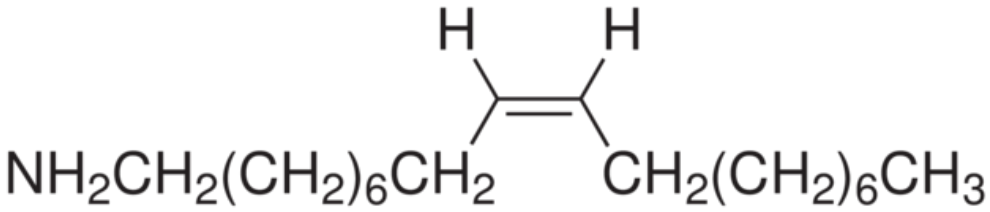

Figura 6. Estrutura química da OAM utilizada neste trabalho.

1.4.2 Polímeros catiônicos

A formação de complexos destes com siRNA resulta de interação iônica entre as partes catiônicas repetitivas do polímero e a cadeia de fosfato aniônica do siRNA. Dependendo da extensão do polímero e quantidade de siRNA, as cargas podem ser neutralizadas, tornando o material genético protegido contra a degradação por RNAses. A principal vantagem do uso de polímeros refere-se a flexibilidade estrutural destes que proporciona manipulação conveniente das características físico-químicas do sistema de liberação. Além disso, as características do polímero, ou seja, o peso molecular, densidade de carga, solubilidade e hidrofobicidade podem ser alteradas, assim como a adição de grupos químicos a este para posterior funcionalização (ALIABARDI et al., 2012).

Nanocarreadores baseados em PEI (Figura 7) oferecem várias vantagens para a complexação com siRNA visto que oferecem alta eficiência de transfecção e escape endossomal eficiente, sendo considerado por muitos como o padrão-ouro para carrear siRNA (OZPOLAT et al., 2010; ALIABARDI et al., 2012), sendo utilizado para carrear siRNA em diferentes tipos de células e de tecidos, visto que apresenta uma extensa capacidade tamponante em uma larga faixa de pH, o que tem importância fundamental no escape endossomal. No entanto, deve-se limitar as concentrações utilizadas deste polímero devido à elevada citotoxicidade que este apresenta (KANG et al., 2010).

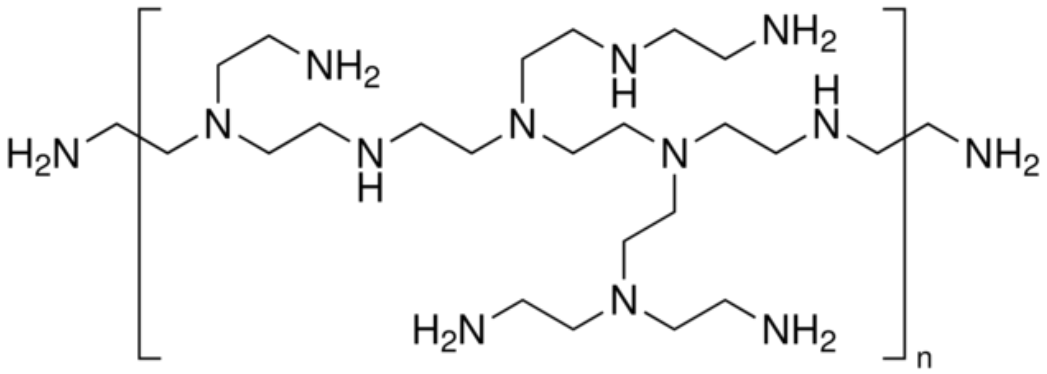

Figura 7. Fórmula estrutural de PEI 25kDa ramificado, utilizado neste trabalho.

1.4.3 Peptídeos de transdução de membrana

De particular interesse são determinadas proteínas e peptídeos que podem ser ligados a fármacos hidrofílicos e assim tornam possível com que estes atravessem membranas, sendo este processo denominado de transdução (TORCHILIN et al., 2008). Estes peptídeos denominados PTDs (*protein transduction domains*) ou CPPs (*cell-penetrating peptides*) podem ser melhor caracterizadas como uma classe de pequenos peptídeos catiônicos contendo entre 10-30 aminoácidos capazes de se ligar às superfícies celulares carregadas negativamente através de interações eletrostáticas e rapidamente induzirem sua própria internalização por diferentes mecanismos de endocitose. Esta interação é de particular interesse, pois propicia a interação destes CPPs aos ácidos nucléicos que possuem carga superficial negativa, tais como DNA e siRNA *in vitro* e *in vivo* (ARTHANARI et al., 2010). A partir disso, são capazes de escapar da vesícula endossomal e ganhar o meio intracelular através de um mecanismo ainda não claramente definido (Figura 8) (MEADE; DOWDY, 2008).

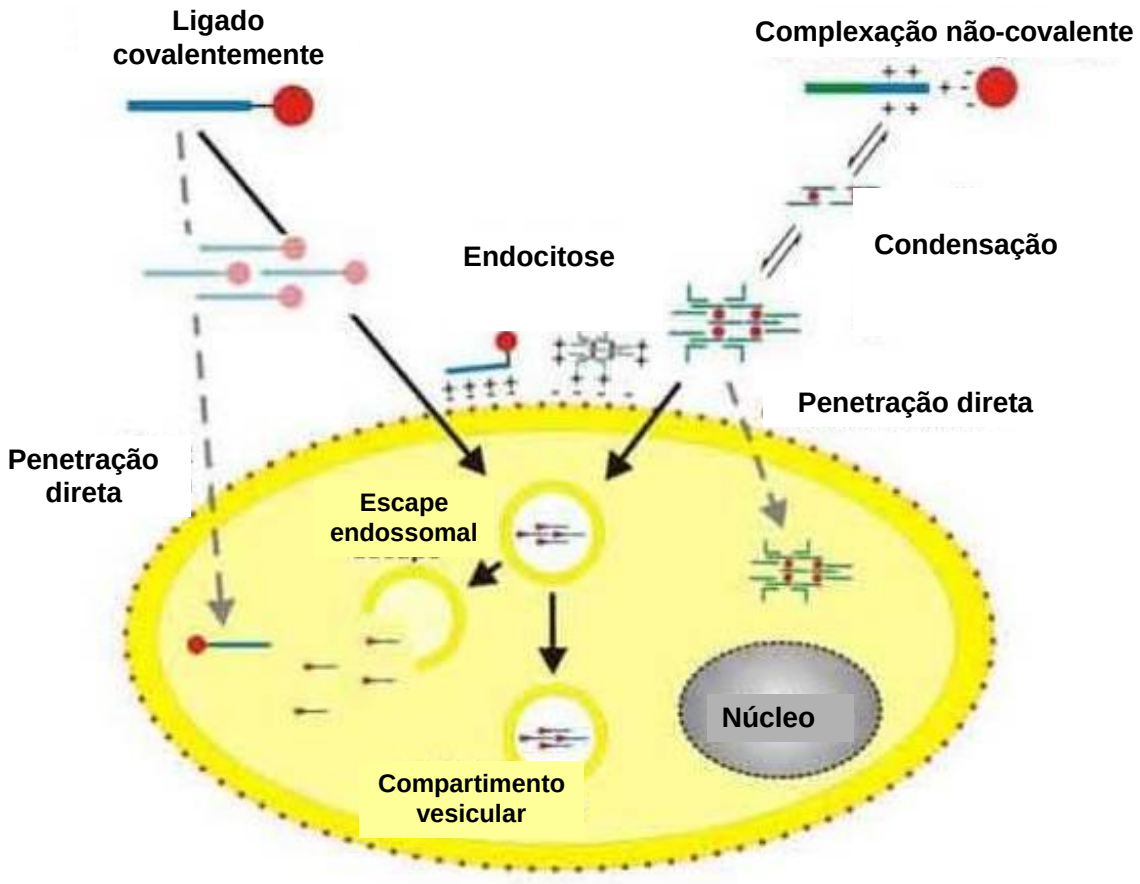

Figura 8. Ilustração esquemática da entrada de peptídeos de transdução de membrana na célula (Adaptado de http://www.molmed.uni-luebeck.de)

Em 1988, os autores Green (GREEN; LOEWENSTEIN, 1998), Frankel (FRANKEL; PABO, 1988) e colaboradores demonstraram a capacidade de internalização de HIV-1 TAT *protein* (TAT), uma proteína codificada pelo vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1), por células *in vitro*, quando introduzida ao meio (TORCHILIN et al., 2008; GREEN; ; LOEWENSTEIN, 1998; FRANKEL; PABO, 1988). O TAT (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg), um peptídeo derivado de proteína é o CPP mais frequentemente usado e deriva da proteína ativadora de transcrição codificada pelo HIV-1, cuja capacidade de transdução se deve à carga positiva no domínio de transdução, composto por seis resíduos de arginina e dois de lisina (TORCHILIN et al., 2008).

Torchilin e colaboradores (TORCHILIN et al., 2001) demonstraram a capacidade do peptídeo TAT em promover a internalização de sistemas carreadores relativamente grandes, no caso lipossomas com cerca de 200 nm

covalentemente ligados. Wang e colaboradores (WANG et al., 2006) recentemente questionaram a necessidade de ligação covalente para que os PTDs atuem e demonstraram que diversos PTDs ricos em arginina não covalentemente ligados a proteínas modelo foram capazes de promover a entrada destas em células nos estudos *in vitro* e *in vivo* realizados. A internalização promovida por TAT também foi demonstrada quando este e outros PTDs marcados com rodamina foram ligados não-covalentemente por Jones e colaboradores (JONES et al., 2005), sendo que o TAT levou cerca de 1h para a internalização e esta não variou conforme os tipos celulares testados (A549, HeLa e CHO).

Penetratin (PNT, Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Leu-Arg-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-His-NH2), o domínio de transdução derivado de um homodomínio de transcrição da antennapaedia, foi também descrito como um dos primeiros PTDs a carrear com sucesso moléculas biologicamente ativas sem alterar a viabilidade celular (JOLIOT et al., 1991; PEREZ et al., 1994; DEROSSI et al., 1994; LAMAZIÈRE et al., 2010), sendo que o mecanismo de internalização deste peptídeo é dependente da concentração extracelular, ou seja, em baixas concentrações este sofre translocação para o interior da célula, enquanto que em altas concentrações ocorre tanto o mecanismo de translocação como o de endocitose (ALVES et al., 2010). A primeira observação direta de que o penetratin era capaz de auxiliar na translocação por membranas lipídicas foi relatada por Thorén e colaboradores (THORÉN et al., 2000) que observaram o *uptake* de penetratin em vesículas gigantes marcadas com carboxifluoresceína por microscopia de fluorescência, demonstrando a afinidade do PTD com as membranas lipídicas negativamente carregadas.

1.5 Sistemas de liberação: os cristais líquidos

Com o intuito de maximizar a atividade farmacológica, muitos sistemas de liberação nanoestruturados têm sido desenvolvidos (SUZUKI et al.,1996). Neste contexto, diversos tipos de lipídeos têm sido extensamente estudados para a veiculação de fármacos em diferentes vias de administração (SHAH et al., 2001).

A monoleína (MO), ou monoleato de glicerila (Figura 9), é uma mistura de monoglicerídeos, glicerídeos do ácido oléico e outros ácidos graxos, consistindo principalmente de monoleato. A cadeia acil do ácido oléico liga-se ao grupamento glicerol através de uma ligação éster. Os dois carbonos restantes do glicerol possuem grupos hidroxila ativos, fornecendo características polares a esta porção da molécula. O grupamento glicerol é capaz de formar ligações de hidrogênio com a água e é freqüentemente considerado o grupamento da cabeça. A cadeia hidrocarbônica fornece características hidrofóbicas aos monoglicerídeos (GANEM-QUINTANAR et al., 2000). É uma molécula atóxica, biodegradável pelo fato de estar sujeita à lipólise por esterases e biocompatível e, por isso, uma candidata potencial a sistema de liberação de fármacos, útil para várias rotas de administração (TURCHIELLO et al., 2003).

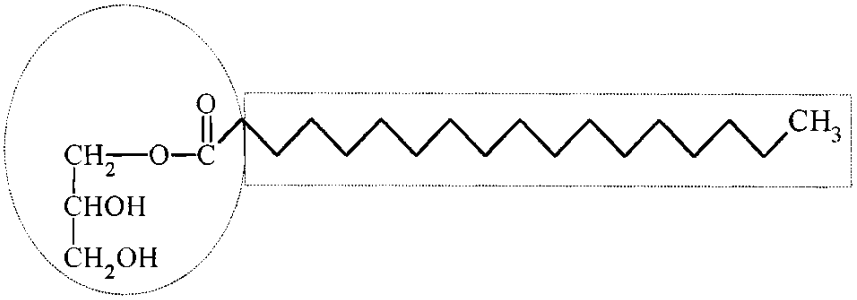

Figura 9: Estrutura química da MO (GANEM-QUINTANAR et al., 2000).

Tal substância é capaz de formar diferentes tipos de cristais líquidos, incluindo as fases cúbica, hexagonal e lamelar, dependendo do conteúdo aquoso, temperatura e natureza das substâncias dissolvidas nos sistemas (GEIL et al., 2000; HAFEZ; CULLIS, 2001), como descrito na Figura 10:

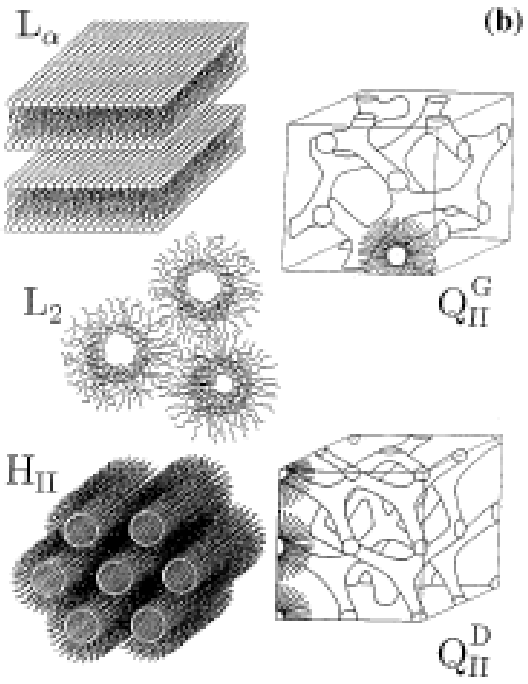

Figura 10: Estrutura de diversas fases líquido-cristalinas formadas pelo sistema binário MO:Água. L_α, Fase Lamelar; L2, Fase Micelar Reversa; HII, Fase Hexagonal Reversa; QIIG, Fase Cúbica Giróide; QIID, Fase Cúbica Diamante. Adaptado de GEIL et al. (2000).

Como pode ser observada na Figura 10, a fase lamelar consiste na disposição linear de moléculas anfifílicas formando bicamadas, as quais se posicionam alternadamente com o conteúdo aquoso. Constitui a forma de organização mais simples, sendo que a orientação das moléculas ocorre somente em sentido unidirecional (SINGH, 2000).

A fase hexagonal, por sua vez, consiste em estruturas cilíndricas infinitas nas quais compartimentos aquosos são separados por camadas de moléculas anfifílicas (fase hexagonal reversa) ou vice-versa (normal). Essas fases organizam-se em dois planos, ou seja, bidirecionalmente (SINGH, 2000; GUO et al.,2010).

Um gel transparente, bastante viscoso, isotrópico e termodinamicamente estável, na presença de excesso de água é característico da fase cúbica. Possui estrutura singular sendo formada por bicamadas curvas que se estendem tridimensionalmente, separados por filmes de água, os quais apresentam dimensões nanométricas. Existem diferentes tipos de fases cúbicas, que podem ser classificadas com base no grupo espacial como as fases primitiva, giróide e diamante (SIDDIG et al.,2004; GUO et al., 2010).

Sendo assim, os cristais líquidos podem ser definidos como o estado da matéria intermediário entre o estado sólido cristalino e líquido isotrópico, também denominado mesomórfico. A diferença básica entre líquidos e cristais sólidos é o estado de ordem; os cristais apresentam ordem posicional e orientacional, enquanto que nos líquidos as moléculas se difundem livremente. Os cristais líquidos, por sua vez, caracterizam-se por manter ordem orientacional, com suas moléculas alinhando-se ao longo de uma direção específica, combinado a organização do estado sólido com a fluidez e mobilidade molecular do estado líquido (SINGH, 2000).

Neste trabalho utilizaram-se nanodispersões de cristais líquidos de fase cúbica e hexagonal que são formadas pela dispersão em excesso de água utilizando-se energia (ultrassom) na presença de um agente estabilizante. Sendo assim, combinam-se as propriedades dos cristais líquidos para a liberação de fármacos, como a sustentação da liberação, com as vantagens de se trabalhar com partículas de dimensão nanométrica, o que facilita a penetração pela barreira da pele (Gustafsson et al., 1997).

A pele é uma rota amplamente usada para a veiculação de fármacos para tratamento local ou sistêmico, porém esta representa uma barreira contra a penetração de partículas. Sendo assim, o desenvolvimento de sistemas carreadores que permitam a utilização desta via para a veiculação de fármacos é de suma importância. A maioria dos sistemas de liberação é baseada em carreadores lipídicos, por exemplo, nanopartículas lipídicas sólidas ou nanoemulsões, que apresentem tamanho de partícula menor do que 300 nm. Nosso grupo já obteve sucesso no uso tanto de sistemas líquido cristalinos como de nanodispersões de cristais líquidos para a veiculação de uma variedade de fármacos, como fotosensibilizadores (ROSSETI et al, 2011, PRAÇA et al, 2012), ciclosporina A (LOPES et al., 2006), vitamina K (LOPES et al, 2007) e mais recentemente na veiculação de siRNA (VICENTINI et al, 2013).

Para a veiculação de moléculas de caráter aniônico como os siRNAs, a utilização de polietilenimina (PEI) ou oleilamina (OAM) nos sistemas se deve ao caráter catiônico, cuja propriedade tem sido muito explorada para a veiculação de oligonucleotídeos, siRNA e DNA plasmidial tanto *in vitro* como *in vivo.* (KIM, 2011).

1.6 Via de administração cutânea para siRNA e usos da terapia cutânea com siRNA

A pele não é apenas o maior órgão do corpo, mas talvez o mais complexo, apresentando no mínimo cinco tipos diferentes de células contribuindo para sua estrutura, enquanto que outros tipos são partes constituintes do sistema circulatório e imune presentes na pele. A estrutura da pele pode ser observada na Figura 11.

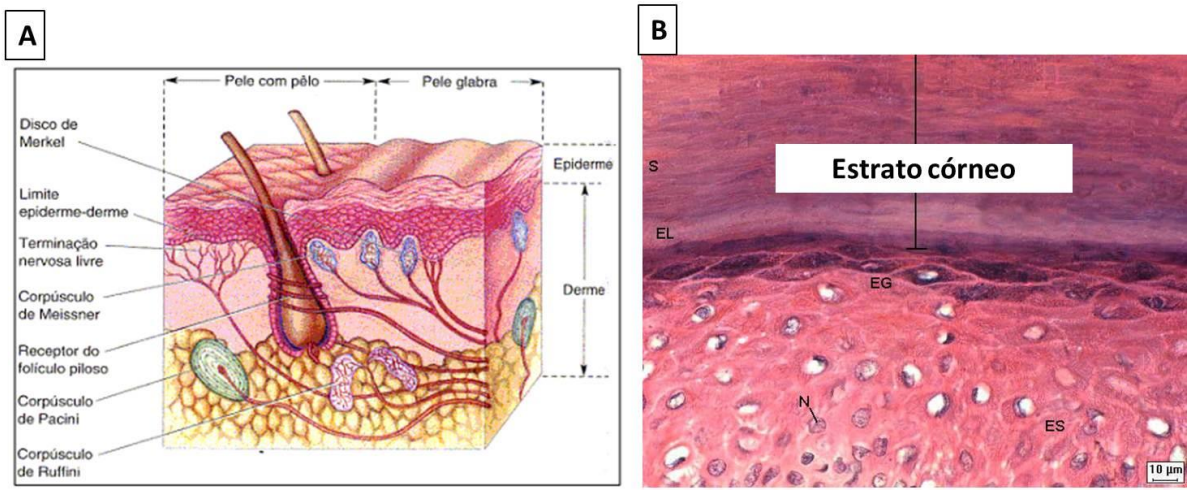

Figura 11: (A) Estrutura esquemática da pele (BEAR et al., 2002) e (B) Destaque para o estrato córneo (Adaptado de http://www.pucrs.br).

A função primordial deste órgão é a proteção contra agentes físicos, químicos, imunológicos, patógenos, radiação UV, dentre outros. Ademais, possui papel na termorregulação e funções endócrinas. Com relação ao uso de fármacos, a pele representa uma barreira e também, em certos casos, uma oportunidade para a passagem de fármacos devido a sua extensa superfície (MENON, 2002). A pele pode ser dividida em quatro camadas, a saber:

- ✓ Camada Basal

Esta camada é composta de células colunares apresentando relação núcleo-citoplasmática alta, organelas celulares e filamentos de queratina (MENON, 2002).

- ✓ Camada Espinhosa

Caracteriza-se pela abundância de desmossomos. Além de organelas típicas e de queratina, as células possuem os “corpos lamelares”, vesículas que contém discos lipídicos compostos por fosfolipídios, colesterol e glicosilceramidas empacotados (MENON, 2002).

- ✓ Camada Granulosa

Suas células apresentam abundância de queratina e corpos lamelares, que são secretados para o meio extracelular na fase final de diferenciação destas células em corneócitos. Cabe ressaltar que a diferenciação é acompanhada do crescimento da lipogênese (MENON, 2002).

- ✓ Estrato Córneo

Trata-se da camada mais externa da epiderme (Figura 9 B) e a principal responsável pela função barreira da pele, sendo composta de corneócitos, que são queratinócitos completamente diferenciados, e pelos conteúdos secretados pelos corpos lamelares. O arranjo espacial desta camada ocasiona a formação de um caminho tortuoso, pelo qual as substâncias tais como fármacos necessitam atravessar, sendo esta camada que limita a permeabilidade da pele (MENON, 2002; HARDING, 2004)

No tratamento de afecções que acometem a pele a administração tópica se torna uma valiosa alternativa devido à redução dos efeitos adversos sistêmicos, evitar o metabolismo de primeira passagem, além de ser uma forma de terapêutica não invasiva, o que facilita a adesão ao tratamento (PRAUZNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004). O estrato córneo, no entanto, representa a principal barreira à administração de fármacos por esta via, o que justifica os esforços para o desenvolvimento de sistemas de liberação.

Desta forma, a liberação tópica de siRNA pode ser utilizada para modular a expressão local de genes responsáveis por uma variedade de doenças tais como psoríase e dermatite atópica, sendo de fundamental importância o uso de sistemas de liberação para este fim (VICENTINI et al., 2013b). Muitos estudos já demonstraram a capacidade de diferentes sistemas de liberação para a veiculação eficiente de siRNA na pele. Como exemplos pode-se citar uso de lipossomas

catiônicos baseados em DOTAP/NaChol para carrear siRNA para células de melanócitos (Geusens et al., 2009), além do uso de um creme tópico contendo siRNA para o tratamento de hipersensibilidade e dermatite atópica (RITPRAJAK; HASHIGUCHI; AZUMA, 2008). Recente publicação de nosso grupo mostrou potencial de nanodispersões de cristais líquidos na veiculação tópica do siRNA (VICENTINI et al., 2013).

1.6.1 Psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória crônica de causa desconhecida que se caracteriza por múltiplas placas eritematosas com proliferação de queratinócitos acelerada gerando a hiperplasia epidermal, infiltração celular, aumento da angiogênese na derme e a hiperegulação local de uma variedade de mediadores inflamatórios (HVID et al., 2008). Nesta doença, o fator de necrose tumoral alfa, o TNF-α, uma citocina pró-inflamatória que está superexpressa nas lesões provenientes da psoríase, representa um excelente alvo para o tratamento desta patologia (JAKOBSEN et al., 2009).

Estudos *in vitro* utilizando siRNA e miRNA encapsulados em lipossomas já demonstraram a eficácia da aplicação destes complexos para o bloqueio da expressão dos marcadores hBD-2, LL37, TNF-α e miR-203 (BRACKE et al., 2011).

O uso de shRNA específico para o marcador TNF-α também demonstrou sucesso *in vivo* após injeção intradérmica através da redução da espessura epidermal, normalização da morfologia da pele e redução dos níveis de RNA mensageiro TNF-α em biópsia realizada três semanas após o tratamento (JAKOBSEN et al., 2009, VICENTINI et al., 2013b).

Dada a importância e o potencial terapêutico da terapia gênica com siRNA para doenças cutâneas de causa genética e das propriedades dos PTDs para promover a penetração celular, a presente pesquisa visa o desenvolvimento farmacotécnico de nanodispersões de cristais líquidos funcionalizadas com PTDs para a liberação cutânea de siRNA. Estudos de transfecção em cultura de células e da eficácia em modelo animal no silenciamento da superexpressão de TNF-α, uma citocina pró-inflamatória que está superexpressa em lesões inflamatórias cutâneas indicarão uma possível aplicação destas formulações na terapia gênica da psoríase.

Objetivos

2.1 Objetivo geral

O trabalho visa o desenvolvimento farmacotécnico de nanodispersões de cristais líquidos contendo monoleína e o polímero catiônico PEI ou o lipídeo catiônico oleilamina e a avaliação *in vitro* e *in vivo* da influência da funcionalização com peptídeos de transdução de membrana para veiculação tópica de siRNA na pele em modelo animal.

2.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos podem-se destacar:

- Preparação e caracterização da complexação das soluções contendo os PTDs TAT e penetratin
- Obtenção/preparo das nanodispersões de cristal-líquido contendo PEI ou OAM e com siRNA funcionalizado ou não com TAT ou penetratin
- Caracterização dos sistemas obtidos através de:
  - Microscopia de luz polarizada
  - Tamanho de partícula e índice de polidispersividade por espalhamento dinâmico da luz
  - Medida da carga superficial por mobilidade eletroforética das partículas na dispersão

- Avaliação da eficiência de complexação dos sistemas com siRNA por eletroforese em gel de agarose
- Avaliação da citoxicidade dos sistemas (ensaio do MTT e citometria de fluxo) em fibroblastos L929
- Avaliação da transfecção por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo em fibroblastos L929
- Avaliação da penetração cutânea *in vivo* dos sistemas obtidos em modelo animal

- Avaliação da eficácia *in vivo* na supressão da expressão de TNF-α *in vivo* utilizando-se siRNA pré-desenhado em modelo animal de psoríase

Material e Métodos

3.1 MATERIAL

3.1.1 Solventes, reagentes e matérias-primas

- Monoleína (MO, *Myverol 18-99®*) - *Quest International, Inc.* (Lindtsedijk, Holanda);
- Ácido oléico (AO) - *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- HIV-1 TAT protein 47-57 (TAT) - *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- DT-3 sal de trifluoroacetato (Penetratin) - *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- Oleilamina (OAM) - *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- Polietilenamina 25 kDa (PEI) - *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- Poloxamer 407- *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) - *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- Fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) - *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- Fenantrolina (PHE) - *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- N-etilmaleimida (NEM)- *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- Dietilpirocarbonato (DEPC)- *Sigma Aldrich Co.* (St. Louis, MO, EUA);
- UltraPureTM Agarose – *Invitrogen*
- Brometo de etídio – *Sigma Aldrich Co*.
- Heparina sódica 5000 UI/mL - Hepamax-S® - Blaüsiegel®
- Tris (hidroximetil) aminometano – *Merck KGaA*
- Fosfato de sódio monobásico - *Vetec*
- Fosfato de sódio dibasic hidratado – *Vetec*
- Cloreto de sódio – *Sigma Aldrich Co*.
- Meio de cultura DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium - *Gibco®*
- Soro bovino fetal - *Gibco®*
- Tripsina-EDTA – *Sigma Aldrich Co.*
- [Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) – *Sigma Aldrich Co*.

- Solução de antibiótico e antimicótico composto por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL – *Sigma Aldrich Co*.
- Tissue-Tec® OCT Compound - *Sakura*
- Água obtida por osmose reversa
- Água ultra pura obtida pelo sistema Milli-Q
- siRNAs controle negativo - *Applied Biosystems* (Brasil) (*Silencer Negative Control #1 siRNA*, Catálogo # AM4635);
- siRNAs marcados com fluoresceína (SiRNA-FAM) - *Applied Biosystems* (Brasil) (*Silencer 6-carboxyfluorescein fluorescently labeled sIRNA targeting GAPDH*, Catálogo # AM4650)
- siRNA pré-desenhado - *Applied Biosystems* (Brasil) (siRNA-TNF-α, *Silencer pre-designed siRNA FAM*, Catálogo # AM16812).
- Kit para quantificação de TNF-alfa eBioscience (Catálogo # 88-7324-88), San Diego, EUA.

3.1.2 Equipamentos e acessórios

- Sonicador de agulha, marca Bandelin, modelo HD2200, potência 200W e frequência 20kHz.
- Zetasize 3000 HSa (Malvern Instruments), laser de HeNe (4 mW/ 633 nm).
- Microscópio óptico (modelo AxioPlan 2 Image, Carl Zeiss) equipado com filtro polarizador e acoplado à câmara digital Axiocan HRc (Carl Zeiss AG, Alemanha)
- Microscópio de fluorescência (modelo Axio Imager A1, Carl Zeiss) com software analisador de imagem (modelo AxioVision, Carl Zeiss)
- Criostato (Leica CM1850)
- SAXS-2, do Laboratório Nacional de Luz Síncroton, Campinas, São Paulo, Brasil.
- Citômetro de fluxo BD FACSCalibur utilizando-se software SellQuest.
- Leitor de placas de Elisa Synergy 2, Biotek Instruments Inc.
- Balança Analítica – Acculab – 110g

- Agitador mecânico tipo mixer – IKa
- Medidor de pH (Digimed)

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Obtenção das soluções contendo o peptídeo TAT ou penetratin

Primeiramente preparou-se água livre de RNAse para ser utilizada nos experimentos adicionando-se 500 µL de reagente dietilpirocarbonato para cada litro de água deionizada. A solução foi mantida em repouso *overnight* e em seguida submetida à autoclavação a 120ºC por 15 min para a eliminação do reagente.

Previamente aos estudos com as nanodispersões, foram preparadas soluções contendo o peptídeo TAT nas concentrações de 0,1mM, 0,25mM e 0,5mM para que a interação entre o siRNA e o peptídeo pudesse ser estudada. Para isso, volumes adequados das soluções dos peptídeos foram adicionados à água livre de RNAse de forma a obter as concentrações desejadas. O siRNA foi adicionado ou não às soluções de forma que as caracterizações posteriores pudessem ser comparadas. Para os estudos com penetratin as concentrações estudadas foram 0,01 mM, 0,025mM e 0,05mM deste peptídeo. O siRNA foi adicionado a estas soluções na concentração final de 10 µM.

As concentrações utilizadas dos PTDs foram baseadas em estudos anteriores (DUCHARDT et al., 2007; SUBRIZI et al., 2012).

3.2.2 Obtenção das nanodispersões de cristal-líquido

As nanodispersões preparadas são compostas por:

- MO (10%)/ fase aquosa (90%);
- MO (10%)/ PEI (0,4%)/ fase aquosa (89,6%);

- MO (8%) / AO (2%) /fase aquosa (90%)
- MO (8%)/ AO (2%)/ PEI (1%)/ fase aquosa (89%)
- MO (10%)/ OAM (1,0%)/ fase aquosa (89,0%);
- MO (8%)/ AO (2%), OAM (2,5%)/ fase aquosa (87,5%);

Todas as nanodispersões foram preparadas de acordo com prévias publicações do grupo (LOPES et al., 2006, PRAÇA et al., 2012, ROSSETI et al. 2011, FERREIRA et al., 2006) e proporções já previamente padronizadas de fase lipídica e fase aquosa (VICENTINI et al., 2013). Primeiramente a MO foi aquecida em banho-maria até a temperatura de fusão (42ºC) e em seguida misturada ao AO na presença ou não de PEI e OAM. A mistura foi homogeneizada e então adicionada a fase aquosa (tampão Tris-HCl 0,1M, pH 6,5 contendo 1,5% (m/m) de poloxamer 407). Os sistemas permaneceram em repouso por 24 h, acondicionados ao abrigo da luz para estabilização, sendo posteriormente sonicados em ultrassom de agulha sob banho de gelo por 2min a 60Hz.

Tais sistemas foram avaliados quanto ao tamanho de partícula e distribuição de tamanho, potencial zeta, citotoxicidade e eficiência de transfecção.

4.2.1 Incorporação dos PTDs

Com o intuito de garantir a interação eletrostática entre siRNA e os PTDs, TAT na concentração de 0,1 mM ou 0,2 mM ou PNT na concentração de 0,025 mM foram acrescidos de siRNA na concentração final de 10 µM, agitados em vórtex a 2500 rpm por 30 s e mantidos em repouso por 30 min para que houvesse complexação. Em seguida, adicionadas as nanodispersões, seguida de agitação em vórtex e 30 min em repouso.

3.2.3 Caracterização dos sistemas obtidos

3.2.3.1 Análise por microscopia de luz polarizada

Previamente à dispersão em excesso de tampão, as diferentes fases líquido-cristalinas foram analisadas em microscópio óptico modelo Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com filtro polarizador e acoplado à câmara digital Axiocan HRc (Carl Zeiss AG, Alemanha) com sistema de vídeo e aquisição automática de imagem após percorrido o tempo necessário para equilíbrio dos sistemas (24 h).

3.2.3.2 Análise do tamanho e índice de polidispersividade das partículas nas dispersões

Foi utilizada a técnica de espalhamento dinâmico da luz (*Light Scattering*) para a análise de tamanho e distribuição de tamanho das partículas. As nanodispersões foram diluídas em água Milli Q (100x) e submetidas às análises no equipamento Zetasizer Nano system ZS (Malvern Instruments). As amostras foram colocadas em celas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medições foram feitas em temperatura ambiente (25ºC). O equipamento possui um lazer de HeNe de 4 mW operando num comprimento de onda de 633 nm e realiza as medições não invasivas por "*backscatter optics*". As medições foram feitas num ângulo de detecção de 173º e a posição da medição da cubeta é automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise.

3.2.3.3 Medida da carga superficial por mobilidade eletroforética das partículas na dispersão

A carga superficial das dispersões foi avaliada através do potencial zeta, determinado pela mobilidade eletroforética das partículas/gotículas dispersas submetidas a um campo elétrico. Estas análises são de grande importância nos estudos, pois auxiliam na determinação das cargas envolvidas na interação de

siRNAs com os sistemas utilizados. Para tais análises foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano system ZS (Malvern Instruments).

3.2.3.4 Difração de raios X de baixo ângulo

Com o intuito de determinar as fases líquido cristalinas em que as nanodispersões se encontravam estas foram também analisadas por medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo. As nanodispersões foram analisadas no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), em Campinas (SP), com a colaboração da Profa. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini do Instituto de Física da USP, na linha de luz DO2A-SAXS2.

As medidas do ângulo de espalhamento 2θ foram realizadas utilizando λ = 0,1608 nm. As medidas de intensidade foram realizadas em função do vetor de espalhamento q ($q = (4\pi \sin \theta)/ \lambda$). As amostras foram acondicionadas em suporte, entre folhas de kapton. As análises foram realizadas em um detector de filamentos bidimensional, por um período de 600 segundos para o sistema MO/AO/OAM e de 900 segundos para os demais sistemas (MO/PEI, MO/OAM e MO/AO/PEI). Os resultados experimentais foram corrigidos pela resposta do detector. A transmissão das amostras e do suporte isolado com as folhas de Kapton foi medida e os dados de SAXS foram normalizados pela transmissão em cada caso, bem como foi removido o espalhamento das folhas de Kapton do espalhamento das amostras.

As estruturas líquido cristalinas foram identificadas através da lei de Bragg, calculando os valores das distâncias interplanares, d. A simetria da estrutura foi determinada associando a distância interplanar aos índices de Miller (DONG; BOYD, 2011).

3.2.4 Avaliação da eficiência de complexação

a) Preparo do gel de agarose 2%

Para o estudo da eficiência de complexação do siRNA, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2% (TRAN et al., 2008). O gel foi preparado usando 2 g de agarose em 120 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA pH=8,0 (TAE) e brometo de etídeo (10 mg/mL). A agarose foi adicionada em tampão TAE e aquecida em microondas por aproximadamente 2 min para promover sua solubilização. Após o resfriamento da solução de agarose, foi adicionado o brometo de etídeo (10 µL). O gel foi vertido na placa de corrida e esperou-se total resfriamento do gel para sua polimerização.

b) Preparo das amostras

Todas as amostras (soluções dos PTDs, nanodispersões acrescidas ou não de siRNA e o controle siRNA em água DEPC) foram preparadas pela adição de 10 µL de loading buffer, tampão utilizado para conferir densidade a amostra aplicada, composto por: azul de bromofenol (0,25 %, p/v), xileno cianol FF (0,25 %, p/v), orange G (0,25 %, p/v), Tris-HCl pH 7,5 (10 mmol/L), EDTA (10 mmol/L) e sacarose (0,65 %, p/v) e 40 µL da amostra a ser analisada. Dessa mistura, aplicou-se cuidadosamente 40 µL em cada poço do gel.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em uma cuba horizontal contendo tampão TAE, utilizando-se para isso voltagem de 100 V e tempo de corrida de 20 min. Os géis previamente adicionados de brometo de etídeo foram observados sob a luz ultravioleta para a visualização das bandas. A aquisição das imagens foi possível com a utilização do software Quantity One.

3.2.5 Avaliação da liberação de siRNA dos complexos obtidos

Com o intuito de avaliar a integridade do siRNA presente nos complexos obtidos, realizou-se um estudo de descomplexação em presença de heparina pelo método de competição com os poliânions de heparina (XIONG et al., 2009; LEE et al., 2010; SHEN et al., 2011). Sendo assim, as amostras contendo siRNA foram preparadas conforme especificado anteriormente e, em seguida, submetidas a

incubação com 10 µL heparina (5000 UI/mL) por 60 min em banho a 37ºC. O siRNA liberado dos complexos foi avaliado por eletroforese em gel de agarose a 2% (100 V, 20 min).

3.2.6 Cultura celular

Os fibroblastos L929 foram cultivados em meio DMEM (Dulbecco-s Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor e 1% (v/v) de solução antibiótica contendo 10.000 IU penicilina, 10 mg estreptomicina e 25 µg anfotericina B por mL. As células foram mantidas em estufa à 37ºC e atmosfera contendo 5% CO_2 e subcultivadas ao atingir a confluência.

3.2.6.1 Avaliação da viabilidade celular

a) Ensaio do MTT

A viabilidade das células submetidas à incubação com as amostras foi avaliada pelo método espectrofotométrico do MTT. Sais de tetrazolium como o MTT são ferramentas comumente empregadas para a avaliação de viabilidade celular em uma variedade de linhagens. Este método se baseia na redução do sal de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] que ocorre quando células viáveis metabolizam-no produzindo um sal de formazan violeta, o qual pode ser solubilizado pela adição de um solvente orgânico como o DMSO (FISICHELLA et al., 2009).

Para este propósito, $5x10^4$ células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h a 37ºC. Então, 20 µL de cada amostra na diluição 1:50 em PBS foram adicionadas e incubou-se por mais 24 h. Por fim, as células foram lavadas com solução salina duas vezes e adicionaram-se 200 µL de meio de cultura sem soro. A solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e as células mantidas em estufa por 4 h. Após este período, o meio foi descartado e os cristais de formazan resultantes foram solubilizados em 200 µL DMSO e 25 µL de tampão glicina (0,2 mol/L, pH 10,2). Medidas de absorvância foram conduzidas em leitor de

placas no comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi calculada como a porcentagem de células viáveis comparadas ao grupo controle, ou seja, aquele em que as células não receberam nenhum tratamento.

b) Citometria de fluxo

Estudos de citometria de fluxo também foram conduzidos para a avaliação da viabilidade das células tratadas com os sistemas desenvolvidos. Para isso, $1x10^6$ células/poço foram cultivadas em placas de seis poços e incubadas por 24h a 37ºC. Então, 200 µL de cada amostra na diluição 1:50 em PBS foram adicionadas e incubou-se por mais 24 h. Por fim, as células foram lavadas com solução salina duas vezes e adicionadas de tripsina, seguida da neutralização desta com meio DMEM completo. As amostras foram submetidas à centrifugação a 1000 rpm por 15 min a 10ºC e o pellet foi ressuspenso em 200 µL de meio incompleto para as análises de citometria de fluxo. As células foram adicionadas de iodeto de propídio e analisadas quanto a presença ou ausência do marcador.

3.2.6.2 Avaliação da transfecção celular em fibroblastos L929

a) Citometria de fluxo

Um *screening* dos sistemas desenvolvidos foi realizado através da avaliação do número de células transfectadas vivas por citometria de fluxo, utilizando-se para isso a análise da presença do marcador fluoresceína, o que indica a transfecção da célula pelo siRNA-FAM e a ausência da marcação por iodeto de propídio, o que indica que estão viáveis. Os sistemas que se mostraram interessantes do ponto de vista de eficiência de transfecção e adequada viabilidade celular foram analisados também por microscopia de fluorescência para a determinação qualitativa da intensidade de fluorescência das células transfectadas, conforme item 3.2.6.2 b.

b) Microscopia de fluorescência

Com o propósito de investigar se os sistemas obtidos eram vantajosos com relação às de soluções de siRNA, foram analisadas tanto as soluções de PTDs contendo siRNA como as nanodispersões obtidas na presença ou ausência de PTDs quanto à transfecção na linhagem celular estudada. Objetivando-se a avaliação por intensidade de fluorescência, incorporou-se siRNA-FAM aos sistemas escolhidos no item anterior.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade de $1x10^6$ células/poço e após 24 h aplicaram-se as amostras preparadas conforme descrito, na diluição de 1:50 (amostra: PBS). Finalmente, as células foram lavadas com PBS e observadas em microscópio de fluorescência (Axioplan 2 Imaging, λexc= 500 nm, λem= 535 nm).

3.2.7 Estudos *in vivo* de penetração cutânea

a) Aplicação das nanodispersões *in vivo* em modelo animal

Estes experimentos foram realizados com camundongos *hairless* de 6 a 8 semanas da linhagem HRS/J mantidos a temperatura ambiente com água e comida *ad libitum*. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo aos guias nacionais de diretrizes de saúde dos animais de experimentação e com a aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto –USP (Protocolo nº 12.1.1374.53.6). Para isso, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 3 a 5 animais e aplicaram-se 100 µL das nanodispersões na região dorsal em uma área de cerca de 2 cm² com auxílio de um pincel. Foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- *Grupo 1:* Controle, aplicação de PBS

- *Grupo 2*: Aplicação solução de PEI 1% contendo siRNA-FAM 10 µM

- *Grupo 3:* Aplicação de solução de PEI 1% contendo siRNA-FAM 10 µM e TAT 0,2 mM.
- *Grupo 4:* Aplicação de siRNA-FAM nu 10 µM
- *Grupo 5:* Aplicação de siRNA-FAM 10 µM acrescido de TAT 0,2 mM
- *Grupo 6:* Aplicação da nanodispersão MO/AO/PEI na presença de siRNA-FAM 10 µM
- *Grupo 7:* Aplicação da nanodispersão MO/AO/PEI na presença de siRNA-FAM 10 µM contendo TAT 0,2 mM

Após 12 h da aplicação, os animais foram sacrificados utilizando-se vapor de dióxido de carbono e a superfície da pele onde foram aplicadas as amostras foi dissecada e analisada para penetração cutânea.

b) Avaliação da penetração cutânea *in vivo* em modelo animal

A avaliação da penetração cutânea in vivo foi realizada por microscopia de fluorescência. Para isso, a região de aplicação das formulações foi congelada em matriz O.T.C. (Tissue Tek®) para permitir a realização de cortes histológicos em criostato. Secções transversais de 10 µm de espessura foram realizadas e os cortes histológicos foram fixados em lâminas extras brancas gelatinizadas previamente preparadas.

Os cortes histológicos foram avaliados pela presença do marcador fluorescente FAM, capaz de demonstrar a localização do siRNA no tecido analisado. Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de fluorescência (modelo Axio Imager A1, Carl Zeiss AG, Alemanha) acoplado a uma câmara fotográfica com software analisador de imagem (modelo AxioVision, Carl Zeiss), utilizando a objetiva de 10 vezes e filtro FS46 com excitação e emissão adequados para o marcador (500 ± 20 nm e 535 ± 30 nm, respectivamente).

3.2.8 Avaliação *in vivo* da eficácia de siRNA pré-desenhado (específico TNF-alfa) em modelo animal

Camundongos *hairless* de 6 a 8 semanas da linhagem HRS/J mantidos a temperatura ambiente com água e comida *ad libitum* foram divididos em grupos 3-5 animais (Protocolo CEUA nº 12.1.1374.53.6). A indução da inflamação foi realizada utilizando-se a aplicação de 100 µL de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), cuja aplicação tópica é um modelo conhecido para a indução de estresse oxidativo, produção de espécies reativas de oxigênio, inflamação cutânea e hiperplasia (HA et al., 2006).

Sendo assim, os animais dos grupos (3), (4), (5) e (6) foram tratados na região dorsal (cerca de 2 cm²) com 100 µL das respectivas formulações. Após 1 hora os animais dos grupos (2), (3), (4), (5) e (6) foram tratados na mesma região com 100 µL de TPA na concentração de 162 µM, conforme esquematizado abaixo:

- *Grupo 1:* Controle negativo, aplicação de PBS
- *Grupo 2*: Controle positivo, aplicação de TPA
- *Grupo 3:* Nanodispersão MO/AO/PEI/ siRNA padrão e TPA
- *Grupo 4:* Nanodispersão MO/AO/PEI/ siRNA pré-desenhado e TPA
- *Grupo 5:* Nanodispersão MO/AO/PEI/ TAT 0,1 mM, siRNA padrão e TPA
- *Grupo 6:* Nanodispersão MO/AO/PEI/ TAT 0,1 mM, siRNA pré-desenhado e TPA

Após 6 horas do início do tratamento com TPA os animais foram eutanasiados com overdose de dióxido de carbono e a pele onde aplicaram-se as formulações foi dissecada para as análises quanto a indução de TNF-α. Para isso as amostras de pele foram previamente preparadas. A preparação das amostras de pele foi realizada através do picotamento das amostras de pele e diluição em tampão Tris 50 mM contendo $CaCl_2$ 10 mM pH 7,4 contendo 0,2 M dos inibidores

fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), fenantrolina (PHE) e N-etilmaleimida (NEM). As amostras foram homogeneizadas em ultraturrax por 2 min e deixadas *overnight* a 4ºC. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 20817 *g* a 4 ºC e sobrenadante foi retirado para dosagem de proteínas pelo método de Bradford seguido de normalização das amostras. As amostras foram então aplicadas em kit para quantificação de TNF- α, ELISA, seguindo as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Estados Unidos).

Com este estudo objetivou-se avaliar a eficácia dos sistemas contendo siRNA na terapia de doenças inflamatórias cutâneas, como a psoríase, cujo principal marcador é a expressão exacerbada de TNF-α.

3.2.9 Análise dos dados

Os dados apresentados são resultados de uma média ± desvio padrão. Os estudos in vivo de eficácia dos sistemas foram analisados utilizando-se teste T não paramétrico Kruskal-Wallis e pós teste de Duns, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism ®, versão 5.

Resultados e Discussão

4.1 Soluções contendo o peptídeo TAT ou penetratin

O uso de PTDs para facilitar a veiculação de diferentes tipos de fármacos vem sendo recentemente estudado. Em geral, os trabalhos utilizam de um PTD covalentemente ligado a uma molécula com ação farmacológica para potencializar sua veiculação. Contudo, estudos anteriores do nosso grupo (LOPES et al., 2005; LOPES et al., 2008) demonstraram que mesmo na ausência de ligação covalente os PTDs são capazes de facilitar a penetração de macromoléculas através de biomembranas. Lopes et al (LOPES et al., 2005) provaram a importância do uso de peptídeos com propriedades de trandução através de biomembranas ao comparar a penetração cutânea promovida por diferentes peptídeos, dentre eles TAT e YARA, peptídeos transdutores e YKAc, um peptídeo sem propriedades de transdução. Lopes e colaboradores (LOPES et al., 2008) demonstraram através do uso do peptídeo modelo P20 que dois diferentes PTDs, mesmo quando não covalentemente ligados ao peptídeo modelo, foram capazes de aumentar a penetração cutânea desse em pelo menos 2,33 vezes.

Objetivando verificar as características dos complexos formados entre siRNA e os PTDs, soluções contendo siRNA a 10 µM os PTDs em diferentes concentrações foram avaliadas quanto ao potencial zeta e grau de complexação. Cabe ressaltar que uma adequada complexação é vantajosa para maximizar a proporção de siRNA/ carreador e facilitar o desenvolvimento de formulações com necessidade de menores doses do fármaco (KAPOOR et al., 2012).

Conforme pode ser observado na Figura 12, o peptídeo catiônico TAT foi capaz de neutralizar a carga negativa da molécula de siRNA (cerca de -70 mV) e os valores obtidos foram proporcionais às concentrações do peptídeo utilizado. Resultados semelhantes foram obtidos para o PNT, porém os valores de potencial zeta não se mostraram proporcionais às concentrações de PTD adicionadas.

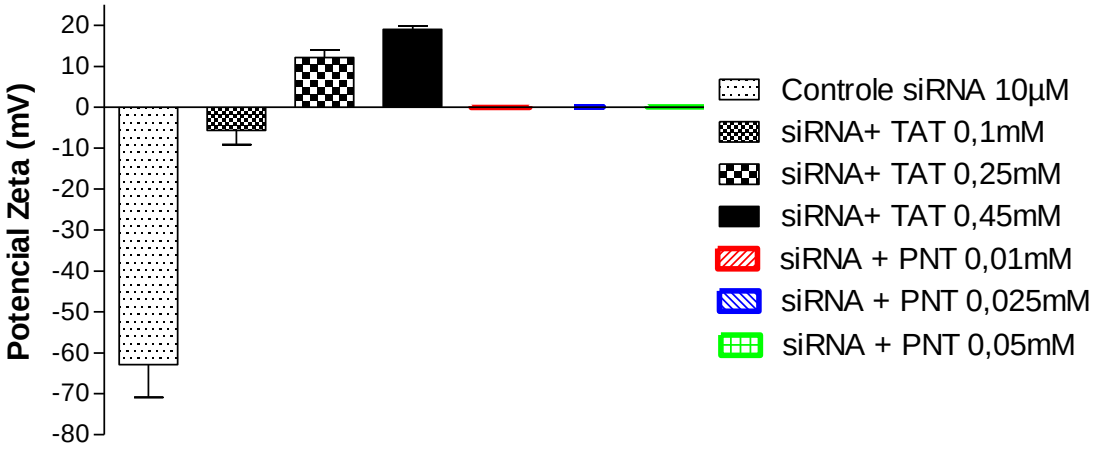

Figura 12: Potenciais zeta obtidos para as soluções de TAT e PNT contendo siRNA.

Resultados semelhantes foram obtidos por Tanaka e colaboradores (TANAKA et al., 2010) quando estudaram complexos de siRNA e o peptídeo STR-CH2R4H2C, sintetizado pelo grupo. O peptídeo em questão é composto de arginina e histidina e por isso pode ser comparado ao peptídeo em estudo no presente trabalho, rico em arginina. Naquele estudo, Tanaka e colaboradores utilizaram diferentes proporções do peptídeo, demonstrando que um aumento na proporção deste é capaz de neutralizar a carga negativa do siRNA através de complexação covalente.

Com o intuito de avaliar se as soluções dos peptídeos catiônicos (não acrescidas de adjuvantes farmacotécnicos) seriam capazes de complexar todo o siRNA adicionado (10 µM), estudos de eletroforese foram conduzidos, conforme pode ser observado na Figura 13.

Entende-se que carrear siRNAs por meio de interações eletrostáticas com PTDs é uma estratégia simples e efetiva, visto que não requer nenhuma modificação no siRNA. Contudo, um excesso de moléculas do peptídeo se faz necessária. No caso da oligoarginina e siRNA, a proporção molar do peptídeo deve ser 56 vezes superior a do siRNA; para o peptídeo MPG deve ser de 84 vezes superior (ENDOH, OHTSUKI, 2009). Estes exemplos estão em concordância com os resultados aqui obtidos visto que a maior complexação do siRNA em solução com o peptídeo TAT foi obtida para uma proporção de TAT cerca de 50 vezes superior a de siRNA (Figuras 12 e 13).

Embora o peptídeo PNT não tenha sido capaz de conferir carga positiva ao sistema como o TAT, estudos já utilizaram concentrações ainda menores com efeitos positivos para carrear fármacos. Khafagy e colaboradores utilizaram 500 µM de L-penetratin para carrear macromoléculas como a insulina e glucagon por via nasal (KHAFAGY et al., 2010), o que indica que não apenas a carga do complexo influencia a capacidade de interação deste com as membranas celulares. Ademais, estudos indicam que concentrações de penetratin a partir de 5 µM foram suficientes para carrear fluoresceína para o interior de células HeLa, sendo a intensidade de fluorescência linearmente aumentada quando utilizada a concentração de 20 µM do PTD (DUCHARDT et al., 2007). Entretanto, este mesmo estudo indicou que para o TAT não há uma resposta linear do aumento da intensidade de fluorescência citoplasmática, indicativo de eficiência de transfecção em função da concentração deste PTD, sendo que a partir de 10 µM já se observa este efeito (DUCHARDT et al., 2007).

Analisada a intensidade de carga dos complexos, torna-se importante a ocorrência de uma complexação efetiva do siRNA na presença dos PTDs, com ausência de bandas interferentes. A adequada complexação do siRNA adicionado foi apenas observada com a utilização da concentrações mais elevada do peptídeo catiônico (0,05 mM para o PNT e 0,5 mM para o TAT), o que é um resultado interessante visto que as diferentes concentrações do peptídeo PNT utilizadas não propiciaram grandes incrementos no valor de potencial zeta (Figura 12), o que confirma que o mecanismo de complexação deste tipo de peptídeo é mais complexo e, portanto, não depende apenas da carga superficial do complexo.

Estudos anteriores realizados por Kim e colaboradores (KIM et al., 2011) também demonstraram a formação de complexos entre siRNA e o peptídeo R15, composto por arginina. Neste estudo também foi observado o retardo na migração do siRNA no gel de eletroforese, quando as proporções entre cargas do peptídeo positivo e do RNA negativo foram superiores a 3/1 (razão N/P), ou seja, a razão de mols de grupos amina nos polímeros catiônicos para o número de mols de fosfato no siRNA, sugerindo que apenas a presença do peptídeo era capaz de promover a complexação do siRNA.

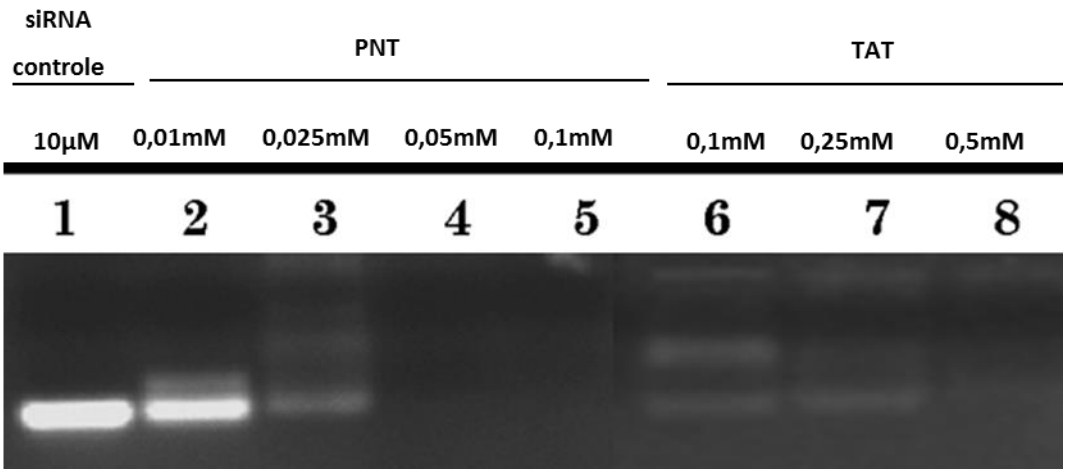

Figura 13: Perfil eletroforético obtido para as soluções de PNT e TAT contendo siRNA.

Através dos estudos de eletroforese (Figura 13) observou-se a necessidade de concentrações de PNT superiores a 0,05 mM e de TAT 0,5 mM para a complexação total do siRNA adicionado, demonstrado pela ausência de bandas características da presença de siRNA livre. Cabe ressaltar que este experimento deixa claro que os complexos entre siRNA e PTDs não dependem apenas da carga superficial, resultando portanto de um mecanismo mais complexo que será oportunamente discutido neste trabalho.

4.2. Caracterização dos sistemas obtidos

4.2.1 Análise por microscopia de luz polarizada

Os resultados obtidos para a microscopia de luz polarizada estão ilustrados na Figura 14.

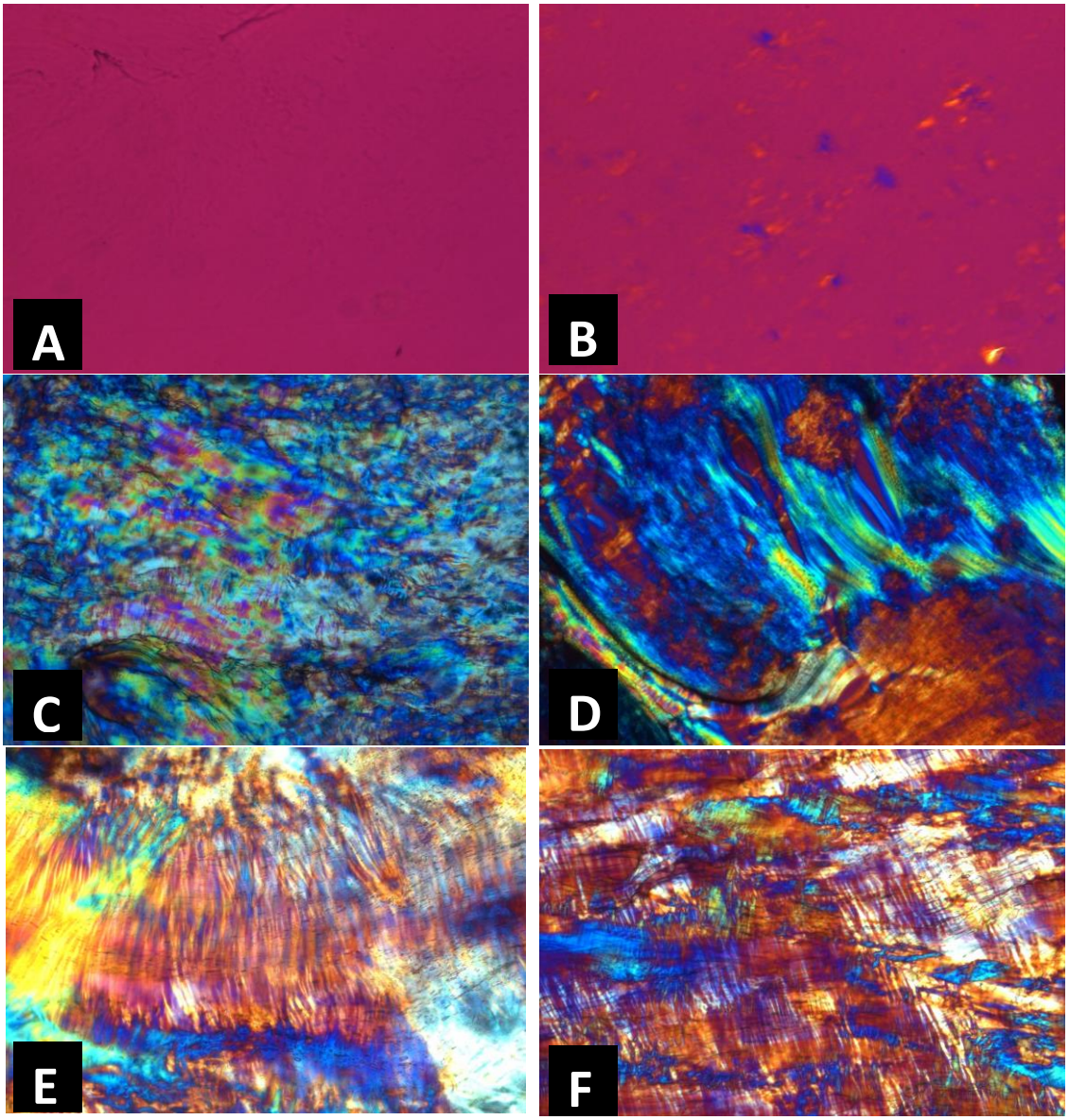

Figura 14: Aparência dos cristais líquidos obtidos sob a microscopia de luz polarizada (aumento 32X) antes da dispersão por ultrassom, sendo: A) MO/fase aquosa (10:90, p/p); B) MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p); C) MO/AO/fase aquosa (8:2:90, p/p/p); D) MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p); E) MO/OAM/ fase aquosa (10:1:89, p/p/p) e F) MO/AO/OAM/fase aquosa (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p).

A Figura 14A ilustra o aspecto isotrópico obtido na presença de formulação composta por MO/fase aquosa, enquanto que em C é possível observar as estriações características da fase hexagonal obtida para o sistema MO/AO/fase aquosa.

Observa-se que a adição do polímero ou lipídeo catiônico não foi capaz de alterar as fases das nanodispersões estudadas (Figura 14), sendo A e B cristais

líquidos de fase cúbica com traços de birrefringência, enquanto que C, D, E, F apresentam aspecto de estriações características de fase hexagonal, aspectos já bem descritos na literatura (SINGH, 2000; GUO et al., 2010). As fases líquido-cristalinas foram precisamente determinadas após estudos de difração de raios-X (item 4.2.4).

Tanto os PTDs TAT e PNT quanto os siRNAs foram adicionados apenas após a dispersão das formulações.

4.2.2. Análise do tamanho e índice de polidispersividade das partículas nas dispersões

As análises de tamanho e índice de polidispersividade das partículas representam uma parte importante do processo de caracterização, pois indicam o grau de homogeneidade e servem de parâmetro para a otimização do processo (KAPOOR et al., 2012). Além disso, no caso específico de vetores para carrear siRNAs, o tamanho de partícula é capaz de influenciar diretamente na habilidade dos complexos em atravessar membranas, o que implica na eficiência de transfecção celular (ZHOU et al., 2012, XU et al., 2007).

Na Figura 15 estão ilustrados os resultados obtidos para as nanodispersões estudadas.

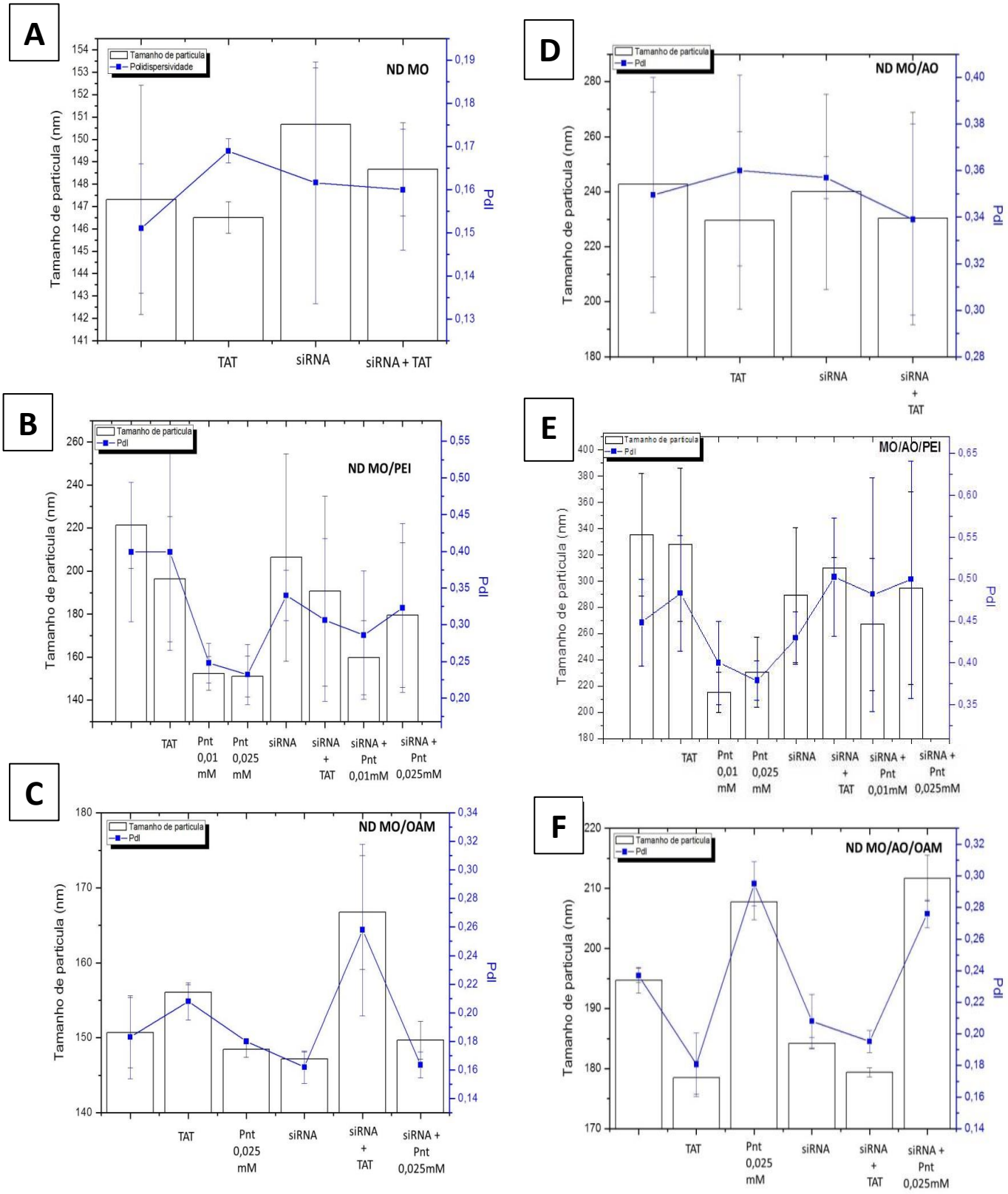

Figura 15: Tamanho de partícula e polidispersividade das nanodispersões estudadas, sendo (A) ND MO/ fase aquosa (10:90, p/p); (B) MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p); (C) ND MO/OAM/fase aquosa (10:1:89, p/p/p); (D) ND MO/AO/ fase aquosa (8:2:90, p/p/p); (E) ND MO/AO/PEI/ fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p) e (F) ND MO/AO/OAM/ fase aquosa (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p).

Os sistemas obtidos apresentaram perfil de tamanho de partícula e distribuição de tamanho de acordo com estudos previamente obtidos por nosso grupo de pesquisa, quando foram utilizados sistemas semelhantes com a incorporação de outros fármacos (LOPES et al., 2006 LOPES et al., 2007). Além disso, a faixa de tamanho de partícula obtida está de acordo com estudos anteriores de Nakano e colaboradores (NAKANO et al., 2001), no qual diferentes concentrações de poloxamer e MO foram utilizadas e propiciaram tamanhos de partícula entre 160 e 270 nm.

A Figura 15 mostra que os diferentes sistemas apresentaram tamanho de partícula na faixa de 150-350 nm, variando de acordo com o sistema utilizado. Resultados semelhantes foram obtidos para complexos contendo PEI de baixo peso molecular, gerando partículas de aproximadamente 300 nm (BREUNIG et al., 2008, LEE et al., 2010). Com relação à polidispersividade, os valores se concentraram entre 0,15- 0,30 para os sistemas na ausência de PEI e na presença de OAM e entre 0,25-0,40 para aqueles contendo PEI. A influência do polímero catiônico PEI pode ser explicada pela sua larga faixa de tamanho e de carga superficial, visto que apresenta uma ampla faixa de peso molecular (LEE et al., 2011). Por outro lado, a adição dos PTDs, a saber, TAT a 0,1 Mm ou PNT a 0,01 mM, não apresentou influência significativa no tamanho de partícula, uma vez que estes devem estar complexados com o siRNA dentro das nanopartículas. As referidas concentrações de PTDs foram escolhidas com base nos estudos anteriores de complexação dos PTDs com siRNA, bem como nos resultados posteriormente apresentados para a complexação de siRNA pelos sistemas líquido cristalinos por eletroforese em gel de agarose.

4.2.3 Medida da carga superficial por mobilidade eletroforética das partículas na dispersão

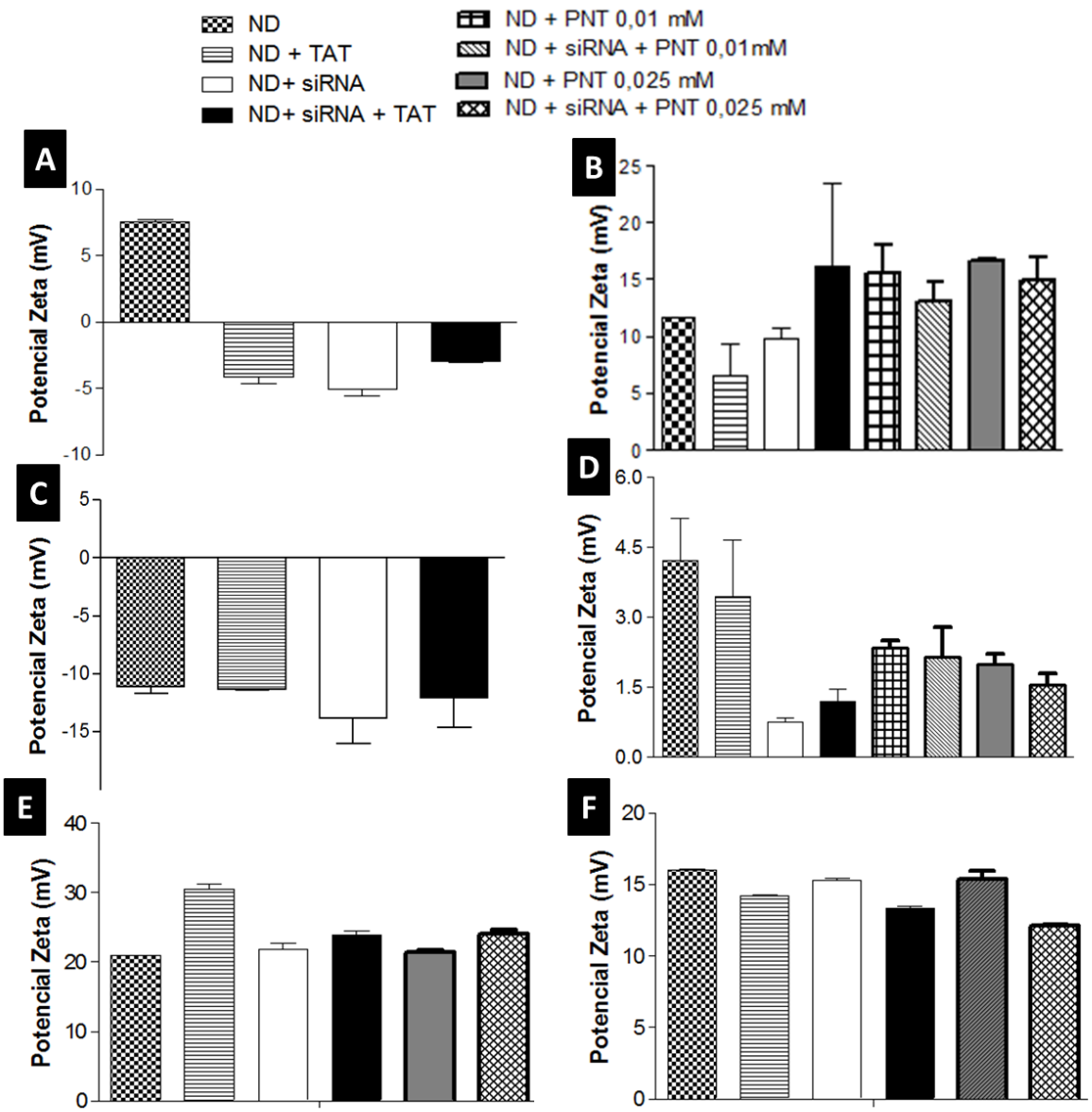

Figura 16: Potenciais zeta das nanodispersões estudadas sendo, A) MO/fase aquosa (10:90, p/p); B) MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p); C) MO/AO/fase aquosa (8:2:90, p/p/p); D) MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p); E) MO/OAM/ fase aquosa (10:1:89, p/p/p) e F) MO/AO/OAM/fase aquosa (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p).

A avaliação do potencial zeta de complexos contendo siRNA é de suma importância no desenvolvimento farmacotécnico, visto que partículas negativamente carregadas tendem a ser depuradas mais rapidamente do que as positivamente

carregadas (OZPOLAT et al., 2010). Neste contexto, carreadores catiônicos tornam-se necessários na veiculação de siRNAs devido a sua forte carga negativa.

Os resultados obtidos para as nanodispersões indicadas nas Figuras 16 B, D, E e F apresentaram residual de carga positivo mesmo após a adição do siRNA, o que indica a complexação e neutralização da carga deste. Isso se deve a presença do polímero catiônico PEI que faz parte de uma classe de polímeros sintéticos largamente utilizados para carrear ácidos nucléicos e sua capacidade de se ligar aos ácidos nucléicos e formar nanocomplexos devido a sua carga positiva (BRUNO, 2011) em B e D. O lipídeo catiônico OAM foi o responsável pela carga positiva conferida ao sistema em E e F.

A nanodispersão indicada na Figura 16 A apresenta residual de carga positivo apenas na ausência de siRNA devido ao fato de ser composta apenas por MO/fase aquosa, enquanto que a nanodispersão da Figura 16 C composta por MO/AO/fase aquosa apresenta-se negativamente carregada em todas as situações testadas devido ao caráter fortemente negativo do AO, tornando-as pouco promissoras para a veiculação de siRNAs.

Complexos contendo PEI já foram vastamente descritos na literatura como carreadores de siRNAs. Sabe-se que PEIs de baixo peso molecular são capazes de complexar moléculas de siRNA contendo até 37 nucleotídeos (WERTH et al.,2006). Poliplexos de PEI com DNA foram estudados por Kunath e colaboradores (KUNATH et al., 2003), visando comparar a eficiência de transfecção promovida por PEIs de alto e de baixo peso molecular. Neste estudo, os autores observaram que, embora os valores de potencial zeta obtidos para os dois tipos de PEIs fossem bastante semelhantes, o PEI de alto peso molecular (25 kDa) foi responsável por uma melhor eficiência de transfecção, embora a citotoxicidade gerada por estes fosse bastante superior ao de baixo peso molecular. Este resultado levou os pesquisadores à conclusão de que PEIs de baixo peso molecular eram mais interessantes para carrear DNA. Desta forma, embora PEIs de alto peso molecular como o utilizado no presente trabalho possam ser interessantes do ponto de vista de eficiência do sistema, a concentração destes polímeros deve ser restringida como forma de manter uma adequada viabilidade celular com as vantagens fornecidas pelo uso destes do ponto de vista de transfecção, o que torna necessário a utilização de outros adjuvantes carreadores que aumentem a penetração destes nas membranas

celulares sem danificá-las, de forma a diminuir as concentrações de PEI necessárias nos sistemas carreadores.

Complexos de PEI/ policaprolactona contendo PEI 25 kDa, por exemplo, já foram descritos na literatura e utlizados com sucesso para carrear siRNAs *in vitro* em células HeLa (LIU et al., 2011). Estes complexos obtidos apresentaram potencial zeta de aproximadamente 20 mV, valores semelhantes aos obtidos neste trabalho para as nanodispersões de MO/PEI. As nanodispersões contendo PEI e adicionadas de AO, por sua vez, apresentaram menores valores de carga superficial, devido à carga negativa inerente do AO.

Ao contrário do PEI, a OAM é um lipídeo catiônico que foi pouco explorado até o momento. Poucos estudos são encontrados na literatura. O seu uso já foi relatado como estabilizante para partículas contendo DNA (BORGES et al., 2011), embora haja diferenças entre siRNAs e DNA tais como tamanho e local da célula que necessitam atingir para poder exercer seu efeito (SCHOROEDER et al., 2009). Suh e colaboradores (SUH et al., 2009) utilizaram o lipídeo OAM para sintetizar um novo lipídeo catiônico baseado em aminoácido para veiculação de siRNA em diferentes linhagens celulares humanas de câncer. Neste estudo, os complexos apresentaram tamanho de partícula de 300 nm, semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Os valores encontrados para potencial zeta das nanodispersões contendo MO/OAM foram semelhantes aos obtidos com emulsões de OAM a 1 mM nos estudos de Martini e colaboradores. Os autores desenvolveram um sistema a base de emulsão para carrear oligonucleotídeos e valores de potencial zeta próximos a 30 mV foram obtidos (MARTINI et al., 2008).

Nesta etapa experimental foi possível selecionar sistemas com baixas concentrações, tanto de polímero quanto de lipídeo catiônico, que complexaram adequadamente o siRNA, o que pode resultar em uma menor citotoxicidade, conforme será demonstrado nos experimentos que se seguem.

4.2.4 Difração de raios X de baixo ângulo

A difração de raio X de baixo ângulo (SAXS) é uma técnica bem estabelecida para investigar aspectos estruturais e as interações em nanoescala. Esta técnica tem permitido não só deduzir informações estruturais estáticas, mas também a dinâmica dos sistemas. Uma das características únicas da radiação Síncronton é o fato de que esta oferece resolução em escala nanométrica e de milisegundos de maneira não facilmente acessível através de outros métodos (NARAYANAN, 2009).

Nesta técnica, um parâmetro de interferência específico surge a partir de distâncias repetidas e este parâmetro é denominado espaçamento intercalar. A partir da equação de Bragg tem-se que o espaçamento intercalar *d* é inversamente proporcional ao ângulo de reflexão, conforme a equação 1:

$$2.d.\text{sen}\theta = n.\lambda \qquad \text{(Equação 1)}$$

onde *n* é igual a um inteiro, *λ* é o comprimento de onda da radiação, *d* é a distância entre dois planos do cristal e *θ* é o ângulo de incidência da radiação. Assim, grandes dimensões de *d* na região de longo alcance podem ser observadas através da difração de raios X de baixo ângulo, enquanto que *d* menores na região de baixo alcance devem ser observadas através da difração de raios X de ângulo largo (MÜLLER- GOYAMANN, 2004). O parâmetro de rede, *a*, de uma unidade repetitiva do cristal é caracterizado por três distâncias axiais, a, b e c e três ângulos interaxiais, α, β e δ. Os diferentes planos de uma unidade do cristal podem ser descritos pelos índices de Miller (*h, k, l)* que denotam o número de planos que interceptam as unidades do eixo a, b e c. Neste trabalho, a nanodispersão estudada possuía fase hexagonal, ou seja, era do tipo II e, portanto, as vesículas ficam acomodadas bidimensionalmente, de acordo com a equação 2, sendo assim, os índices de Miller seguem a razão 1/1; √3; √4 (WINTER, 2002).

$$s = \frac{2}{\sqrt{3}a}\sqrt{h^2 + k^2 + hk} \qquad \text{(Equação 2)}$$

a) MO/PEI

A Figura 17 ilustra o perfil obtido por difração de raios X de baixo ângulo para a nanodispersão MO/PEI na presença de diferentes aditivos. Observam-se sete picos de difração, característicos de transição de fase cúbica e hexagonal. A presença de siRNA ou PTDs não foi capaz de alterar a estrutura líquido cristalina da referida nanodispersão.

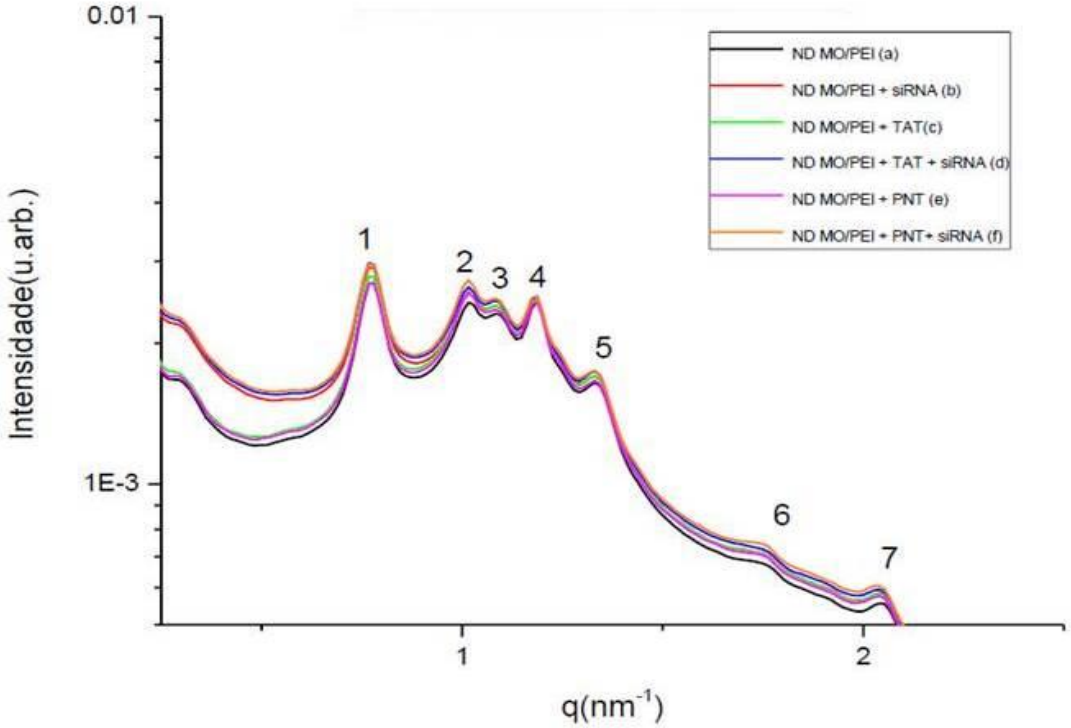

Figura 17: Difratograma para a nanodispersão (ND) MO/PEI.

Tabela 2: Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões do sistema MO/PEI/FA incorporados com TAT 0,1 mM, PNT 0,025 mM e/ou siRNA 10 µM.

	q (nm^{-1})	d (nm)	Razão	Parâmetro de rede, a (nm)	Estrutura
ND	0,7740	8,0489	1:1		Cúbica D
	1,0185	6,1691	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0997	5,7135	1:√2	a_c=8,10 ± 0,05	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1844	5,3050	1:1	a_h=7,15 ± 0,04	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,3313	4,7194	1:√3		Cúbica D
	1,7509	3,5884	1:√5(pico1) 1:√3 (pico2)	a_h=6,124 ± 0,002	Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
	2,0525	3,0611	1:√7 (pico1) 1:√3 (pico4)		Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
ND + siRNA	0,7740	8,0489	1:1		Cúbica D
	1,0172	6,1769	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0980	5,7224	1:√2	a_c=8,11 ± 0,06	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1880	5,2889	1: 1	a_h=7,15 ± 0,03	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,3313	4,7194	1:√3		Cúbica D
	1,7509	3,5884	1:√5(pico1) 1:√3 (pico2)	a_h=6,13 ± 0,04	Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
	2,0394	3,0808	1:√7 (pico1) 1:√3 (pico4)		Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
ND + TAT	0,7740	8,0489	1:1		Cúbica D
	1,0126	6,2050	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0873	5,8887	1:√2	a_c=8,13 ± 0,06	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1823	5,3144	1: 1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,3313	4,7194	1:√3	a_h=7,17 ± 0,01	Cúbica D
	1,7509	3,5884	1:√5(pico1) 1:√3 (pico2)	a_h=6,15 ± 0,02	Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
	2,0394	3,0808	1:√7 1:raiz4(pico2)		Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
ND + TAT + siRNA	0,7740	8,0489	1:1		Cúbica D
	1,0131	6,1804	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0912	5,8058	1:√2	a_c=8,14 ± 0,07	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1817	5,2927	1: 1	a_h=7,16 ± 0,03	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,3313	4,7194	1:√3		Cúbica D
	1,7509	3,5884	1:√5(pico1) 1:√3 (pico2)	a_h=6,14 ± 0,04	Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
	2,0394	3,0808	1:√7 1:raiz4(pico2)		Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
ND + PNT	0,7740	8,0489	1:1		Cúbica D
	1,0138	6,1804	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0901	5,8057	1:√2	a_c=8,14 ± 0,07	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1823	5,3144	1:1	a_h=7,16 ± 0,03	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,3313	4,7194	1:√3		Cúbica D
	1,7509	3,5884	1:√5(pico1) 1:√3 (pico2)	a_h=6,15 ± 0,02	Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
	2,0394	3,0808	1:√7 (pico1) 1:√3 (pico4)		Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d

Tabela 2 (continuação)

ND + PNT + siRNA	0,7740	8,0489	1:1		Cúbica D
	1,0130	6,1804	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0901	5,8058	1:√2	a_c=8,13 ± 0,07	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1806	5,3220	1: 1	a_h=7,16 ± 0,03	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,3313	4,7194	1:√3		Cúbica D
			1:√5(pico1)	a_h=6,15 ± 0,01	Cúbica D
	1,7509	3,5884	1:√3 (pico2)		Hexagonal (110) a = 2d
			1:√7 (pico1)		Cúbica D
	2,0394	3,0808	1:√3 (pico4)		Hexagonal (110) a = 2d

b) MO/OAM

Na Figura 18 observa-se o perfil obtido por difração de raios X de baixo ângulo para a nanodispersão MO/OAM na presença de diferentes aditivos. Observam-se 8 picos de difração, característicos de transição de fase cúbica e hexagonal e a amostra também não apresentou variações na sua estrutura em função dos diferentes aditivos.

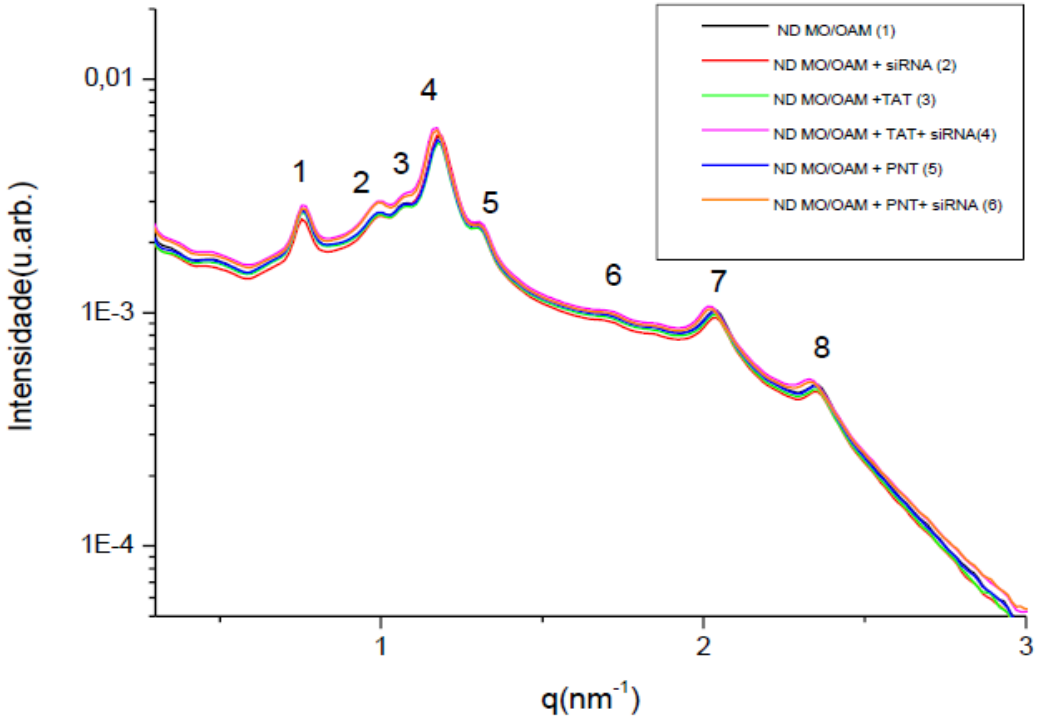

Figura 18: Difratograma nanodispersão MO/OAM.

Tabela 3: Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões do sistema MO/OAM/FA incorporados com TAT 0,1 mM, PNT 0,025 mM e/ou siRNA 10 μM.

	q (nm^{-1})	d (nm)	Razão	Parâmetro de rede, a (nm)	Estrutura
ND	0,7609	8,2576	1:1		Cúbica D
	1,0074	6,2370	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0924	5,7517	1:√2	a_c=8,24 ± 0,16	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1787	5,3306	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,2792	4,9118	1:√3	a_h=7,24 ± 0,06	Cúbica D (fit Gaussiana 4)
			1:√5		Cúbica D
	1,7247	3,6430	1:√3(pico2)	a_h=6,16 ± 0,01	Hexagonal (110) a = 2d
			1:√7		Cúbica D
	2,0394	3,0808	1:√3(pico4)		Hexagonal (110) a = 2d
ND + siRNA	0,7609	8,2576	1:1		Cúbica D
	0,9971	6,3015	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0914	5,7570	1:√2	a_c=8,24 ± 0,15	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1804	5,3229	1:1	a_h=7,280 ± 0,007	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,2800	4,9087	1:√3		Cúbica D (fit Gaussiana 4)
			1:√5		Cúbica D
	1,7247	3,6430	1:√3(pico2)	a_h=6,157 ± 0,009	Hexagonal (110) a = 2d
			1:√7		Cúbica D
	2,0394	3,0808	1:√3(pico4)		Hexagonal (110) a = 2d
ND + TAT	0,7609	8,2576	1:1		Cúbica D
	0,9871	6,3653	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0680	5,8831	1:√2	a_c=8,22 ± 0,08	Cúbica D
	1,1797	5,3261	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,1584	5,4240	1:√3	a_h=7,32 ± 0,05	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 4)
			1:√5		Cúbica D
	1,7247	3,6430	1:√3(pico2)	a_h=6,18 ± 0,05	Hexagonal (110) a = 2d
			1:√7		Cúbica D
	2,0394	3,0808	1:√3(pico4)		Hexagonal (110) a = 2d
ND + TAT + siRNA	0,7609	8,2576	1:1		Cúbica D
	0,9978	6,2970	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0742	5,8492	1:√2	a_c=8,25 ± 0,07	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1711	5,3652	1:1	a_h=7,28 ± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,3050	4,8147	1:√3		Cúbica D
			1:√5	a_h=6,21 ± 0,03	Cúbica D
	1,7247	3,6430	1:√3(pico2)		Hexagonal (110) a = 2d
	2,0132	3,1209	1:√7		Cúbica D
ND + PNT	0,7609	8,2576	1:1	a_c=8,22 ± 0,09	Cúbica D
	0,9890	6,3531	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0667	5,8903	1:√2	a_h=7,31 ± 0,04	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1796	5,3265	1:1	a_h=6,18 ± 0,06	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,1570	5,4306	1:√3		Cúbica D (fit Gaussiana 4)
			1:√5		Cúbica D
	1,7247	3,6430	1:√3(pico2)		Hexagonal (110) a = 2d

Tabela 3 (continuação)

	2,0394	3,0808	1:√7 1:√3(pico4)		Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
ND + PNT + siRNA	0,7609	8,2576	1:1		Cúbica D
	0,9904	6,3440	1:1		Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 1)
	1,0691	5,8707	1:√2	a_c=8,24 ± 0,06	Cúbica D (fit Gaussiana 2)
	1,1740	5,3519	1:1	a_h=7,31 ± 0,03	Hexagonal (100) a = 2d/√3 (fit Gaussiana 3)
	1,3182	4,7663	1:√3		Cúbica D
	1,7247	3,6430	1:√5 1:√3(pico2)	a_h=6,21 ± 0,04	Cúbica D Hexagonal (110) a = 2d
	2,0132	3,1209	1:√7		Cúbica D

c) MO/AO/PEI

A Figura 19 ilustra os resultados obtidos para a análise por difração de raios X de baixo ângulo para a nanodispersão MO/AO/PEI.

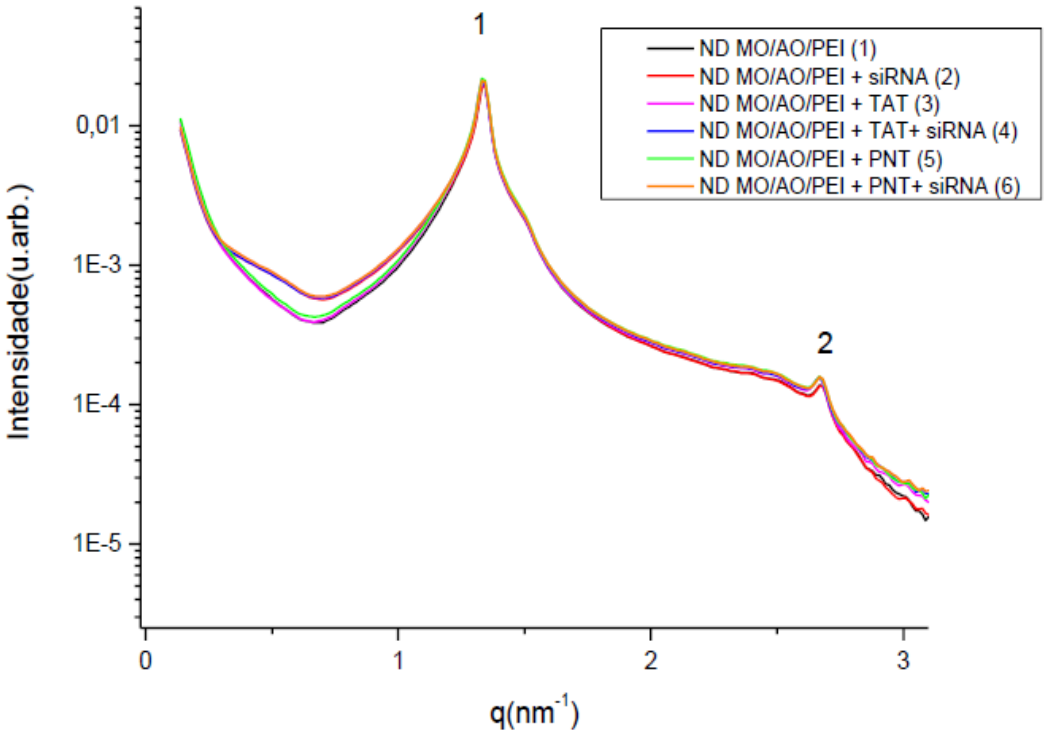

Figura 19: Difratograma para a nanodispersão MO/AO/PEI.

Tabela 4: Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões do sistema MO/AO/PEI/FA incorporados com TAT 0,1 mM, PNT 0,025 mM e/ou siRNA 10 µM.

	q (nm^{-1})	d (nm)	Razão	Parâmetro de rede, a (nm)	Estrutura
ND	1,3444 2,6688	4,6735 2,3542	1:1 1: √4	a_h=5,42± 0,02	Hexagonal (100) a = 2d/√3 Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + siRNA	1,3444 2,6688	4,6735 2,3542	1:1 1: √4	a_h=5,42± 0,02	Hexagonal (100) a = 2d/√3 Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + TAT	1,3313 2,6688	4,7194 2,3542	1:1 1: √4	a_h=5,44± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3 Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + siRNA TAT	1,3313 2,6688	4,7194 2,3542	1:1 1: √4	a_h=5,44± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3 Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + PNT	1,3313 2,6688	4,7194 2,3542	1:1 1: √4	a_h=5,44± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3 Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + siRNA PNT	1,3313 2,6688	4,7194 2,3542	1:1 1: √4	ah=5,44± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3 Hexagonal (200) a = 4d/√3

Observam-se dois picos com reflexões nas razões de 1:1 e 1: √4, sugerindo a organização em fase hexagonal. Não ocorreram alterações na estrutura na presença dos diferentes aditivos da formulação.

d) MO/AO/OAM

Na Figura 20 observam-se três reflexões nas razões de 1:1, 1:√3 e 1: √4 características de fase líquido cristalina hexagonal. Não houve diferenças significativas na estrutura dos cristais líquidos na presença dos PTDs ou de siRNA.

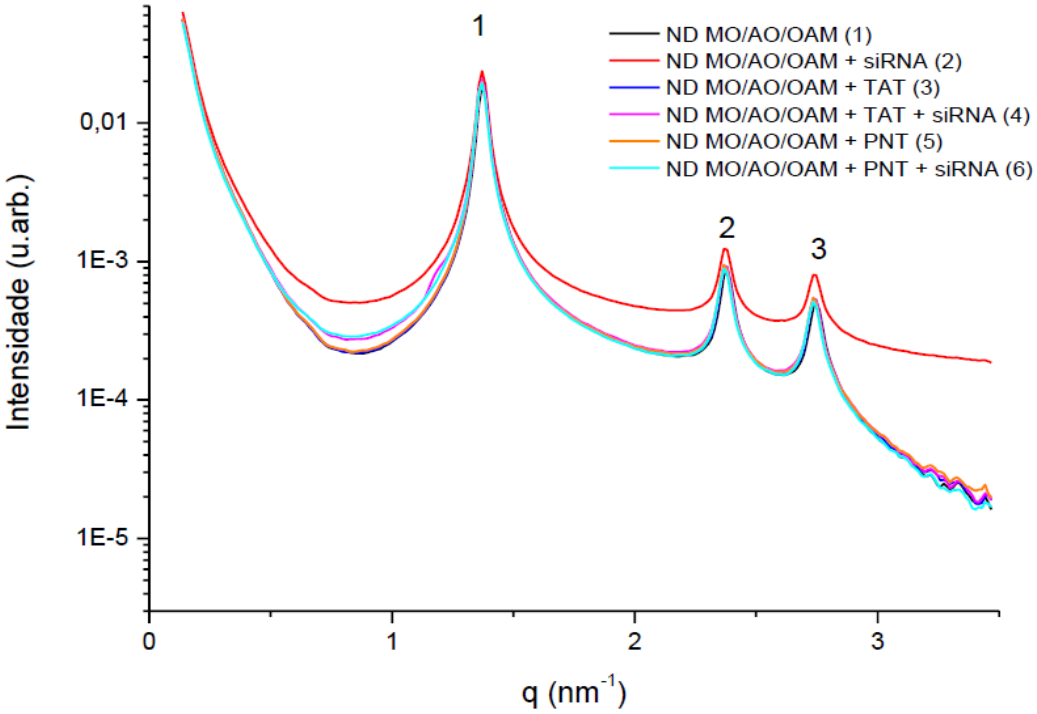

Figura 20: Difratograma para a nanodispersão MO/AO/OAM.

Tabela 5: Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões do sistema MO/AO/OAM/FA incorporados com TAT 0,1 mM, PNT 0,025 mM e/ou siRNA 10 μM.

	q (nm^{-1})	d (nm)	Razão	Parâmetro de rede, a (nm)	Estrutura
ND	1,3706	4,5841	1:1	a_h=5,30± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3
	2,3672	2,6542	1: √3	a_h=6,12± 0,01	Hexagonal (200) a = 4d/√3
	2,7344	2,2978	1:√4		Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + siRNA	1,3706	4,5841	1:1	a_h=5,30± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3
	2,3672	2,6542	1: √3	a_h=6,12± 0,01	Hexagonal (200) a = 4d/√3
	2,7344	2,2978	1:√4		Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + TAT	1,3706	4,5841	1:1	a_h=5,30± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3
	2,3672	2,6542	1: √3	a_h=6,12± 0,01	Hexagonal (200) a = 4d/√3
	2,7344	2,2978	1:√4		Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + siRNA TAT	1,3706	4,5841	1:1	a_h=5,30± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3
	2,3672	2,6542	1: √3	a_h=6,12± 0,01	Hexagonal (200) a = 4d/√3
	2,7344	2,2978	1:√4		Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + PNT	1,3706	4,5841	1:1	a_h=5,30± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3
	2,3672	2,6542	1: √3	a_h=6,12± 0,01	Hexagonal (200) a = 4d/√3
	2,7344	2,2978	1:√4		Hexagonal (200) a = 4d/√3
ND + siRNA PNT	1,3706	4,5841	1:1	a_h=5,30± 0,01	Hexagonal (100) a = 2d/√3
	2,3672	2,6542	1: √3	a_h=6,12± 0,01	Hexagonal (200) a = 4d/√3
	2,7344	2,2978	1:√4		Hexagonal (200) a = 4d/√3

Para todos os sistemas líquido cristalinos analisados a adição de siRNA e PTDs não alterou o parâmetro de rede das formas hexagonal e cúbica, sugerindo que as moléculas foram adsorvidas na superfície das partículas (LIBSTER et al., 2007).

4.3 Avaliação da eficiência de complexação

A confirmação do indicativo de complexação entre siRNA e as nanodispersões estudadas (potencial zeta positivo) foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a ser demonstrada pelo desaparecimento das bandas de siRNA livre devido à neutralização de carga, o que significa que os complexos com carga negativa devem migrar no gel enquanto que aqueles com

carga positiva ou neutra devem manter-se no topo do gel (ZHOU et al., 2012). Através destes experimentos (Figura 21) foi possível observar que a complexação entre o siRNA e as nanodispersões compostas por MO/PEI e MO/AO/PEI foram fortes o suficiente para retardar a migração do siRNA no gel eletroforético devido à neutralização da carga negativa do siRNA. Estes resultados estão de acordo com os que foram observados por Nimesh e Chandra (NIMESH, CHANDRA, 2009) quando estes estudaram a interação entre o polímero PEI e siRNA em nanopartículas. Sabe-se que os complexos formados resultam de interações eletrostáticas entre a extremidade fosfato negativamente carregada e o polímero positivamente carregado em sua superfície (LEE et al., 2011).

É interessante observar o efeito da adição dos PTDs na nanodispersão composta por MO, visto que a presença, tanto de TAT na concentração de 0,1 mM, como de PNT a 0,025 mM foram capazes de causar o desaparecimento das bandas relativas ao siRNA livre. Tal fato pode ser justificado pelo caráter catiônico destes peptídeos, que foram capazes de neutralizar a carga negativa do siRNA a valores próximos à neutralidade como mostrados na seção 5.2.3, gerando a complexação do siRNA adicionado.

As nanodispersões contendo MO/AO na ausência de PEI não foram capazes de promover esta complexação devido ao elevado residual de carga negativa do AO já observada na avaliação do potencial zeta, o que faz com que a nanodispersão fique com carga negativa e não seja capaz de complexar o siRNA.

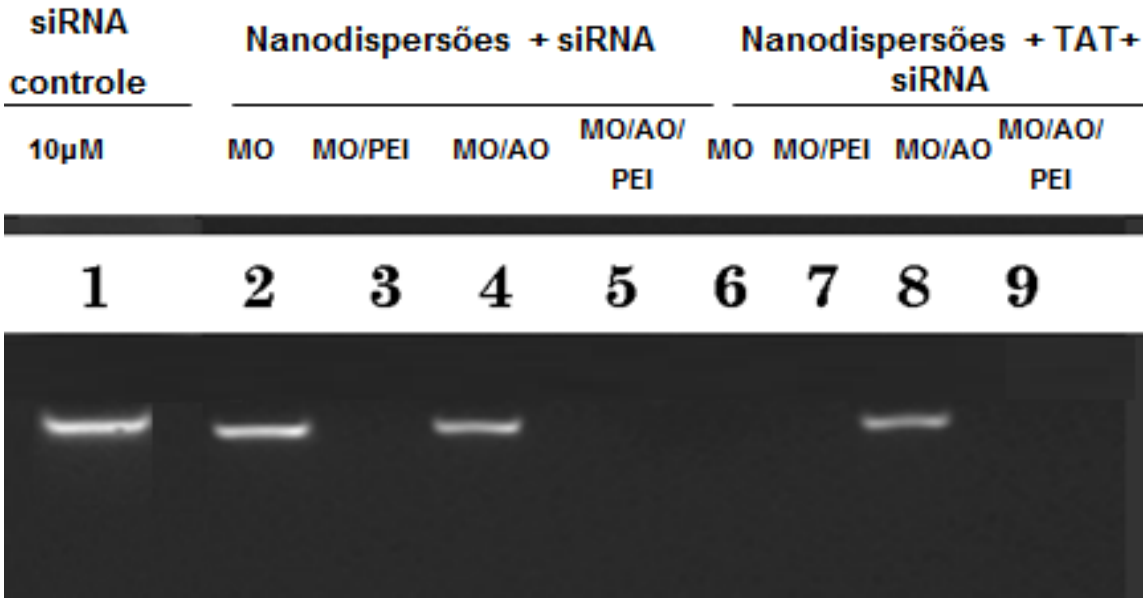

Figura 21: Perfil eletroforético das nanodispersões compostas por MO/fase aquosa (10:90, p/p), MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p), MO/AO/fase aquosa (8:2:90, p/p/p), MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p) na presença de siRNA (10 µM) e/ou TAT (0,1 mM).

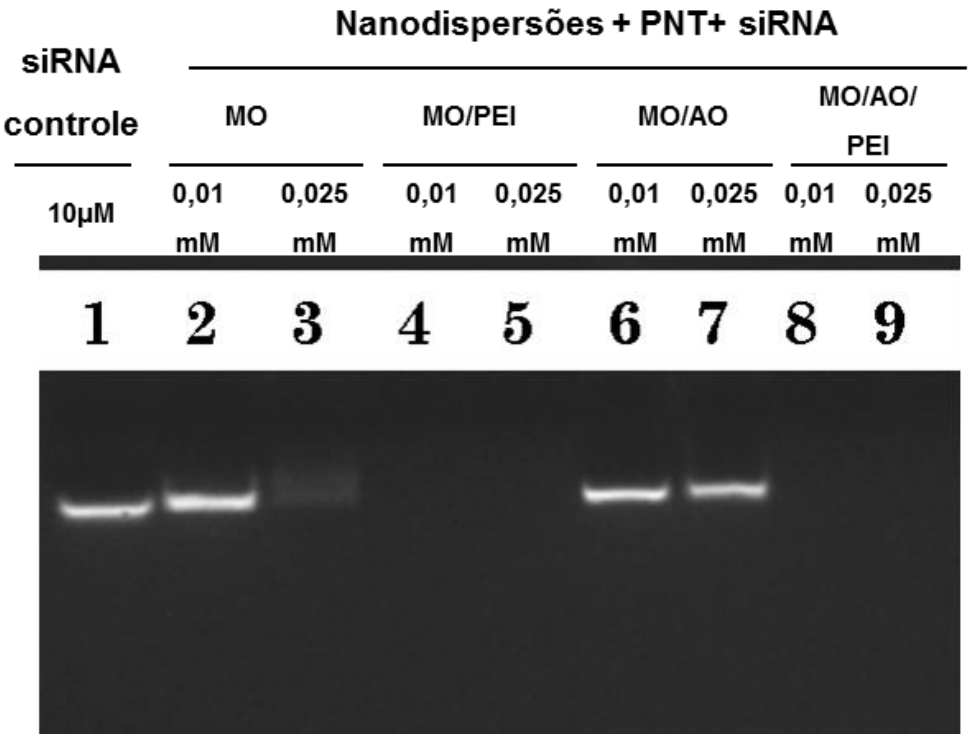

Figura 22: Perfil eletroforético das nanodispersões compostas por MO/fase aquosa (10:90, p/p), MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p), MO/AO/fase aquosa (8:2:90,

p/p/p), MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p) na presença de siRNA (10µM) e PNT em diferentes concentrações (0,01 mM e 0,025 mM).

Conforme apresentado na Figura 23, todas as nanodispersões contendo OAM foram capazes de complexar o siRNA adicionado, mesmo na ausência dos PTDs. Conforme um mecanismo já proposto, cargas negativas provenientes dos ácidos nucléicos são capazes de interagir eletrostaticamente com nanoestruturas lipídicas formando lipoplexos (SCHOROEDER et al., 2009)

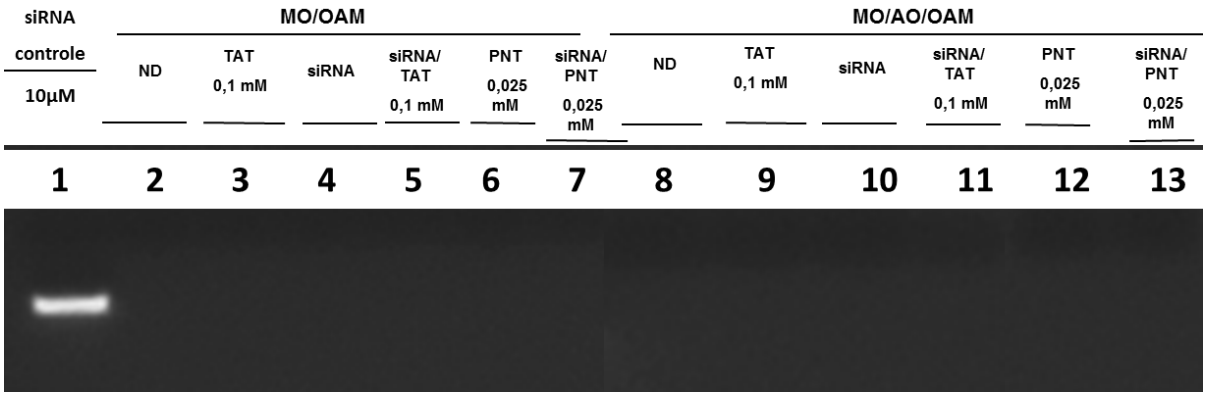

Figura 23: Perfil eletroforético das nanodispersões compostas por MO/OAM/ fase aquosa (10:1:89, p/p/p) e MO/AO/OAM/fase aquosa (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p) na presença de siRNA (10µM) e/ou TAT 0,1 mM ou PNT 0,025 mM.

4.4 Avaliação da liberação de siRNA dos complexos obtidos

Com o intuito de garantir que o siRNA chegue ao seu alvo intacto, os complexos devem ser suficientemente estáveis durante o percurso a ser realizado, porém o siRNA deve ser liberado no citosol para que ocorra o silenciamento gênico. O uso de heparina, um poliânion comercial tem sido o método utilizado para avaliar a liberação de siRNAs e investigar sua estabilidade. A heparina sódica é capaz de induzir a descomplexação do siRNA visto que sua característica de poliânion faz com que esta tenha competição com o siRNA, cuja característica aniônica é menor que a da mesma, havendo então competição pela ligação à nanodispersão

positivamente carregada. Assim, o siRNA é liberado do complexo e fica visível em uma corrida eletroforética (ZHOU et al., 2012; QI et al., 2012). A partir deste ponto é possível verificar se houve ou não degradação de siRNA pela presença de rastros que indiquem a ocorrência de degradação. A Figura 24 ilustra os resultados obtidos para diferentes amostras testadas frente à heparina.

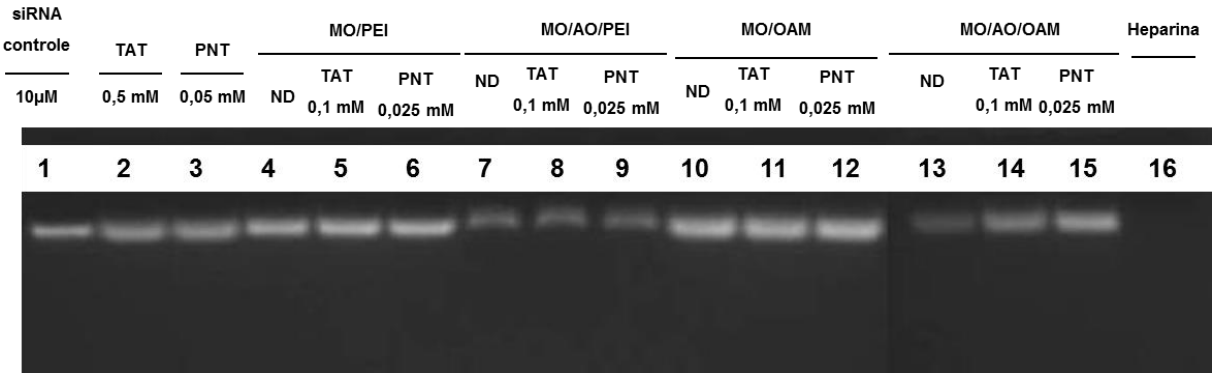

Figura 24: Perfil eletroforético na presença de heparina (5000 UI/mL). As bandas representam o siRNA descomplexado para as amostras estudadas.

Após a incubação com heparina o siRNA foi adequadamente liberado de todos os complexos formados, o que pode ser confirmado com a observação das bandas relativas à presença de siRNA livre (Figura 24). A presença de bandas mais fracas pode ser atribuída a diferença na aplicação das amostras nos poços. Estes resultados indicam que os sistemas desenvolvidos são adequados para carrear siRNAs visto que o estabilizam e o liberam conforme o esperado para sistemas a serem utilizados com tal finalidade.

4.5 Avaliação da viabilidade celular

a) Ensaio do MTT

A viabilidade celular dos complexos contendo PEI e/ou PTDs foi verificada na presença de células L929. A Figura 25 demonstra os resultados obtidos para as amostras com tempo de incubação de 24 h.

Conforme pode ser observado na Figura 25A, mesmo na presença de siRNA, as diferentes concentrações de TAT, mesmo na presença de siRNA não foram capazes de alterar significativamente a viabilidade celular, embora essas apresentem diferença estatisticamente significativa ao controle que corresponde ao cultivo das células de fibroblastos não submetidas a tratamentos. Como esperado, o tratamento com PBS não apresentou valores de viabilidade celular estatisticamente diferentes ao controle, sendo que o mesmo foi observado na presença de PNT. Como controle positivo de morte celular, foi utilizado o reagente Triton X-100 0,5%, apresentando morte celular superior a 90%, devido a rápida morte celular induzida pelo aumento da permeabilidade de membrana decorrente do caráter tensoativo desta molécula (WEYERMANN et al., 2005).

Na Figura 25 B estão representadas as viabilidades celulares das nanodispersões compostas por MO, MO/PEI e MO/AO/PEI na presença ou na ausência de PTDs. A aplicação de nanodispersões causou efeitos de citotoxicidade para as amostras compostas por MO, MO/PEI e TAT 0,1 mM, MO/PEI e PNT 0,025 mM e MO/AO/PEI contendo diferentes concentrações de PNT testadas, conforme pode ser observado pela viabilidade celular estatisticamente diferente em relação ao controle. Neste estudo não foi observado dose dependência para os PTDs em relação à citotoxicidade.

Na Figura 25 C estão ilustrados os controles PEI 1% e OAM 2,5% na presença ou na ausência de PTDs, sendo que se observou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para todas as amostras testadas, com exceção do controle PEI na ausência de PTDs, o que pode ser atribuído à limitação do método. Cabe ressaltar que embora métodos *in vitro* como o

MTT possuam limitações, este apresentam a vantagem de permitir um *screening* de diversas formulações sem o uso de animais (MONTEIRO-RIVIERE; ZHANG 2009)

Na Figura 25 D observam-se os resultados para o ensaio do MTT das nanodispersões contendo OAM. A citotoxicidade das nanodispersões na ausência de AO apresentou-se estatisticamente semelhantes ao controle, enquanto que na presença de AO a vibilidade celular foi marcadamente reduzida para valores de aproximadamente 40%, demonstrando a elevada toxicidade da OAM quando associada ao AO.

Recentemente, os estudos colorimétricos como o MTT têm apresentado resultados inadequados para algumas moléculas, gerando valores falsos induzindo a uma má interpretação dos resultados. As principais razões atribuídas a este problema são a interações químicas dos compostos testados com o MTT ou a interferência na atividade da desidrogenase mitocondrial levando a superestimação (ativação das desidrogenases redutoras do MTT) ou subestimação (inibição das desidrogenases mitocondriais) dos resultados obtidos. Neste sentido, autores sugerem o uso de um segundo método para a avaliação da viabilidade celular e confirmação dos resultados obtidos, sugerindo o uso do método da exclusão do iodeto de propídio para moléculas cujo teste do MTT não gera resultados confiáveis como, por exemplo, a doxorrubicina (JASZCZYSZYN; GĄSIOROWSKI 2008). Neste sentido optou-se por avaliar a viabilidade celular pelo método da exclusão por iodeto de propídio utilizando-se para isso da marcação com esse reagente e análise por citometria de fluxo.

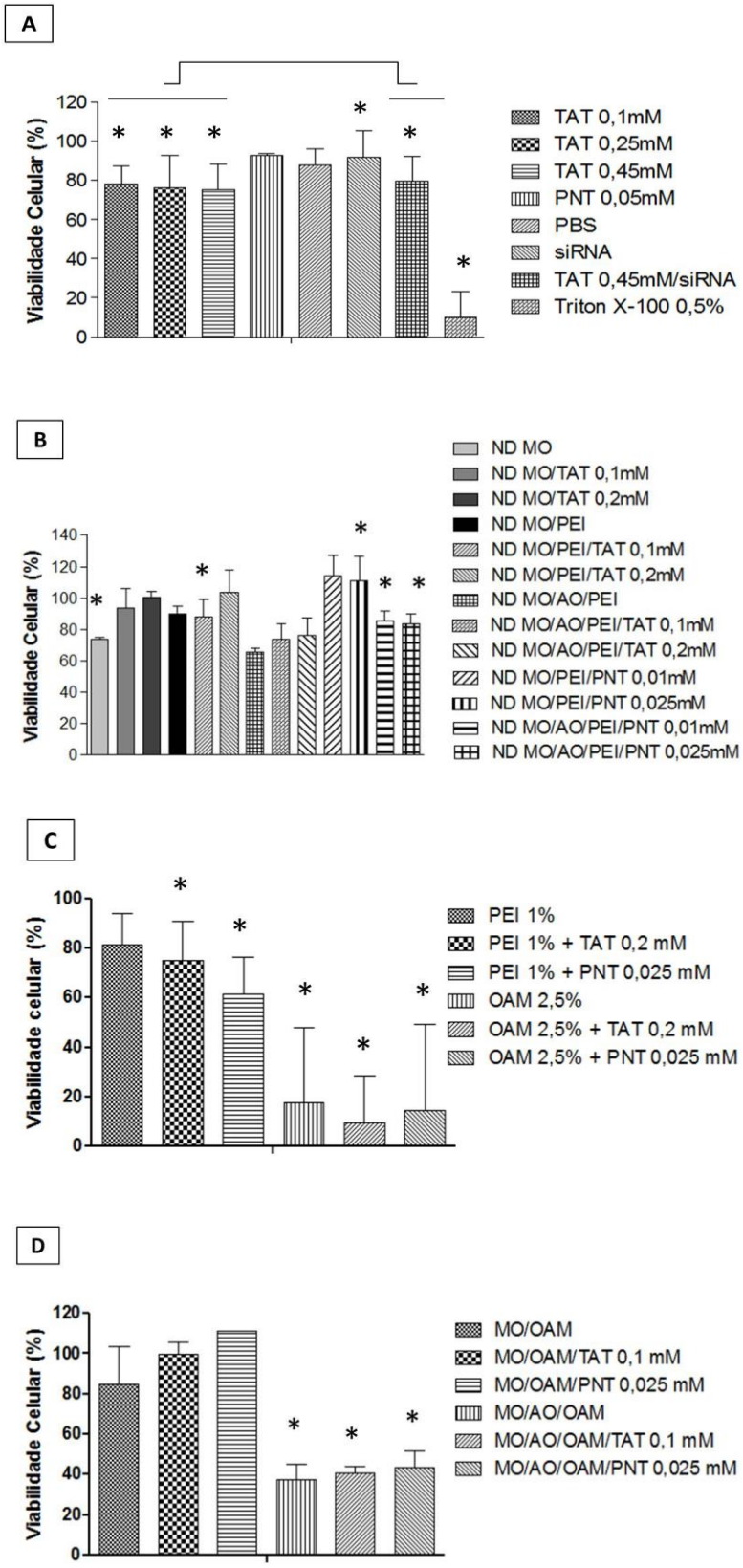

Figura 25: Taxas de viabilidade celular em células L929 por MTT para as diferentes formulações estudadas com tempo de incubação de 24 h. Aplicação de teste

estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, *p < 0,05 em relação ao controle. Controle utilizado: células cultivadas na ausência de tratamento.

b) Citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite a análise simultânea de diversas características de partículas de uma população, contudo a utilização de sondas fluorescentes permite a análise de muitos outros parâmetros como o conteúdo celular e suas propriedades. O iodeto de propídio é um marcador fluorescente que se liga ao DNA e é capaz de penetrar apenas em células mortas, sendo considerada uma sonda para a análise da viabilidade celular (MESQUITA et al., 2012).

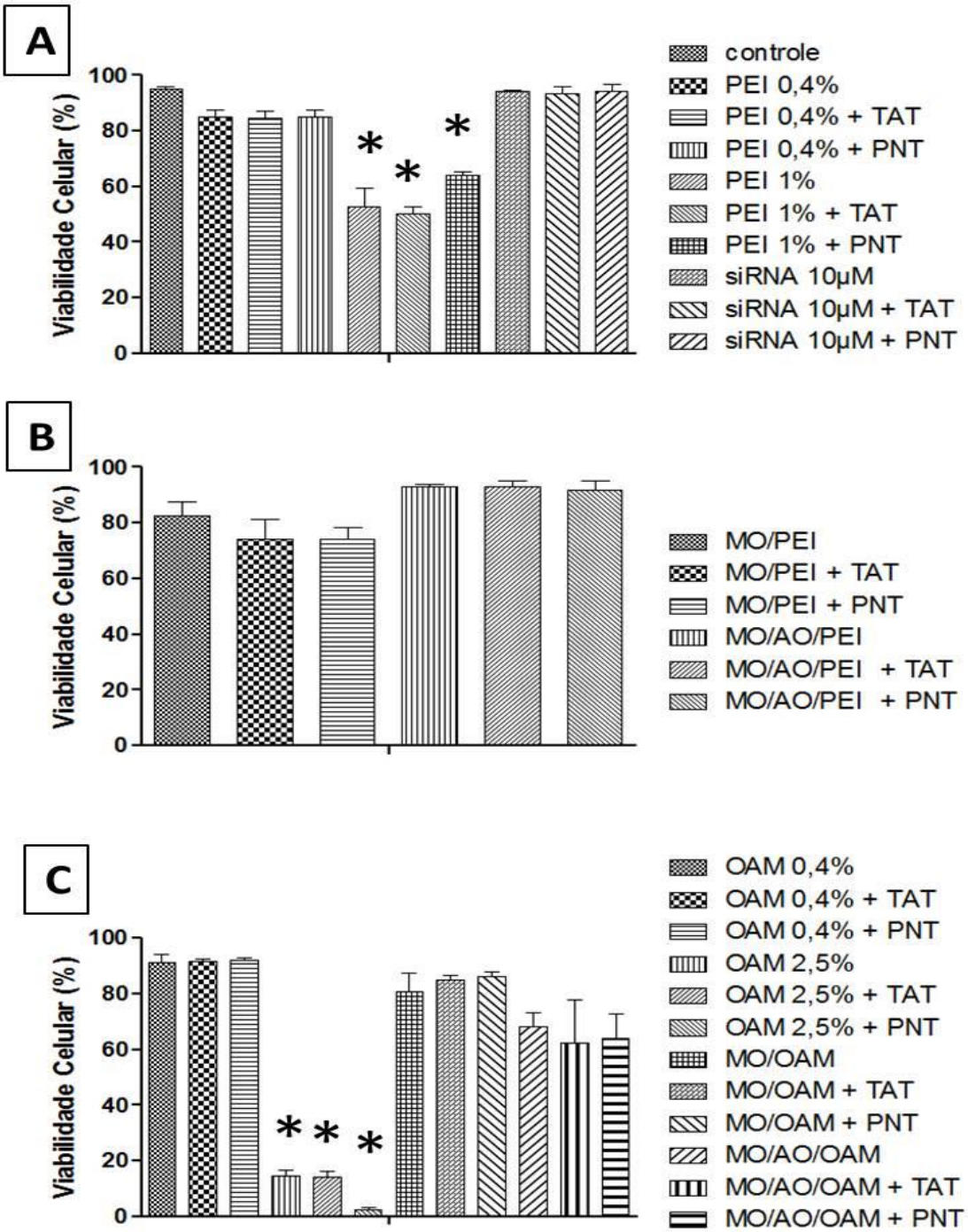

Figura 26: Taxas de viabilidade celular em células L929 por citometria de fluxo para as diferentes formulações estudadas com tempo de incubação de 24 horas. Aplicação de teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, *p < 0,05 em relação ao controle. Controle utilizado: células cultivadas na ausência de tratamento.

Conforme pode ser observado na Figura 26, para o ensaio com iodeto de propídio apenas o controle PEI 1% (Figura 26 A) e OAM 2,5% (Figura 26 C) na

presença dos PTDs apresentaram viabilidades celulares estatisticamente diferentes do controle, sendo a OAM fortemente tóxica para a linhagem celular testada.

As nanodispersões desenvolvidas nesse projeto apresentaram valores adequados de viabilidade celular frente às células de fibroblastos L929, sendo os maiores valores obtidos para as nanodispersões compostas por MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p/) e MO/OAM/ fase aquosa (10:1:89, p/p/p/) o que demonstra sua adequabilidade para administração pela via tópica na pele.

4.6 Avaliação da transfecção celular em fibroblastos L929

a) Citometria de fluxo

Os estudos por citometria de fluxo siRNA marcado com fluoresceína foi utilizado para avaliar o *uptake* de siRNA pelos fibroblastos nos diferentes sistemas analisados. A Figura 27 ilustra os resultados para transfecção para os sistemas que se apresentaram estatisticamente diferentes do controle não tratado ($p < 0,05$). Observa-se uma maior porcentagem de células transfectadas para o sistema composto pela nanodispersão MO/AO/PEI na presença ou na ausência de PTDs, seguido pelo controle PEI a 0,4%. Tais resultados estão também relacionados aos sistemas que apresentaram adequadas viabilidades celulares (acima de 90%). Os sistemas compostos por PEI 1% na presença ou ausência de PTDs apresentaram porcentagens de transfecção celular inferiores ao sistema contendo PEI 0,4%, isso se deve a maior morte celular nos sistemas com maior concentração de PEI visto que os poliplexos são atraídos pela membrana celular e são capazes de gerar danos à integridade de membrana (WEBER et al., 2012).

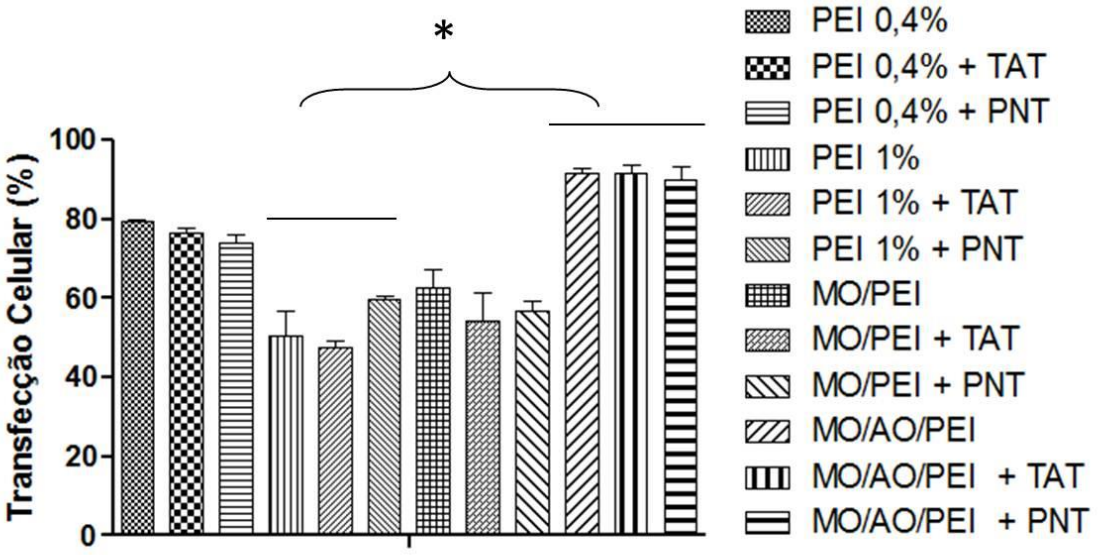

Figura 27: Resultados obtidos para células positivas para FAM por citometria de fluxo em células L929 para as diferentes formulações estudadas com tempo de incubação de 24 h. Aplicação de teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns, *p < 0,05. Controle utilizado: células cultivadas na ausência de tratamento.

Sistemas nanodispersos compostos por OAM, contendo ou não AO e PTDs, não apresentaram valores de transfecção celulares estatisticamente distintos do controle, embora tenham sido capazes de complexar o siRNA efetivamente (Figura 21) e liberá-lo em presença de heparina (Figura 24). Sistemas contendo OAM para carrear materiais genéticos como siRNA e DNA são raros na literatura (BORGES et al., 2011, VICENTINI et al., 2013) e não há estudos que demonstrem que, embora este lipídeo seja capaz de conferir carga positiva aos sistemas, estes sejam também capazes de promover a transfecção celular. Desta maneira, supõe-se que mecanisticamente a OAM não favoreça a transfecção celular, embora seja capaz de aumentar a retenção cutânea de siRNAs quando comparado à penetração do siRNA nu (VICENTINI et al., 2013). Isso pode ser atribuído ao potencial zeta, que deve representar um balanço entre valores positivos capazes de complexar e proteger o siRNA, mas que não sejam suficientes para causar danos na membrana que prejudiquem sua integridade e comprometam a transfecção, conforme resultados obtidos para a viabilidade celular no item 5.3.

Desta forma, as nanodispersões de cristais líquidos contendo PEI na presença ou ausência de AO e PTDs foram escolhidos para os estudos posteriores por microscopia de fluorescência.

b) Microscopia de fluorescência

Estudos de transfecção celular com o uso de siRNA-FAM foram realizados em L929 visando observar qualitativamente a eficiência de transfecção dos diferentes sistemas desenvolvidos. A Figura 28 mostra o aspecto das células utilizadas na ausência de luz fluorescente e na presença de siRNA-FAM nu na presença ou ausência de soluções de PTDs.

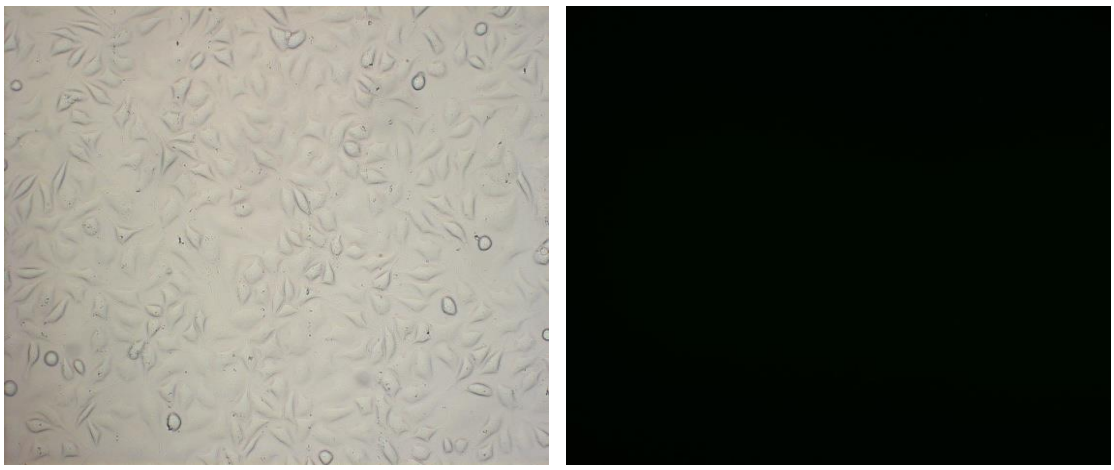

Figura 28. Visualização das células L929 na ausência de luz fluorescente (esquerda) e quando incubadas com siRNA-FAM e soluções dos PTDs (TAT 0,5 mM e PNT 0,05 mM) por 24 h (direita, ausência total de fluorescência para soluções de siRNA contendo ou não PTDs), aumento de 20 vezes.

Não foi observada transfecção das soluções de PTDs contendo siRNA na linhagem celular estudada embora estes tenham sido capazes de complexar o siRNA nas concentrações testadas conforme verificado nos estudos de eletroforese em gel de agarose (Figura 13).

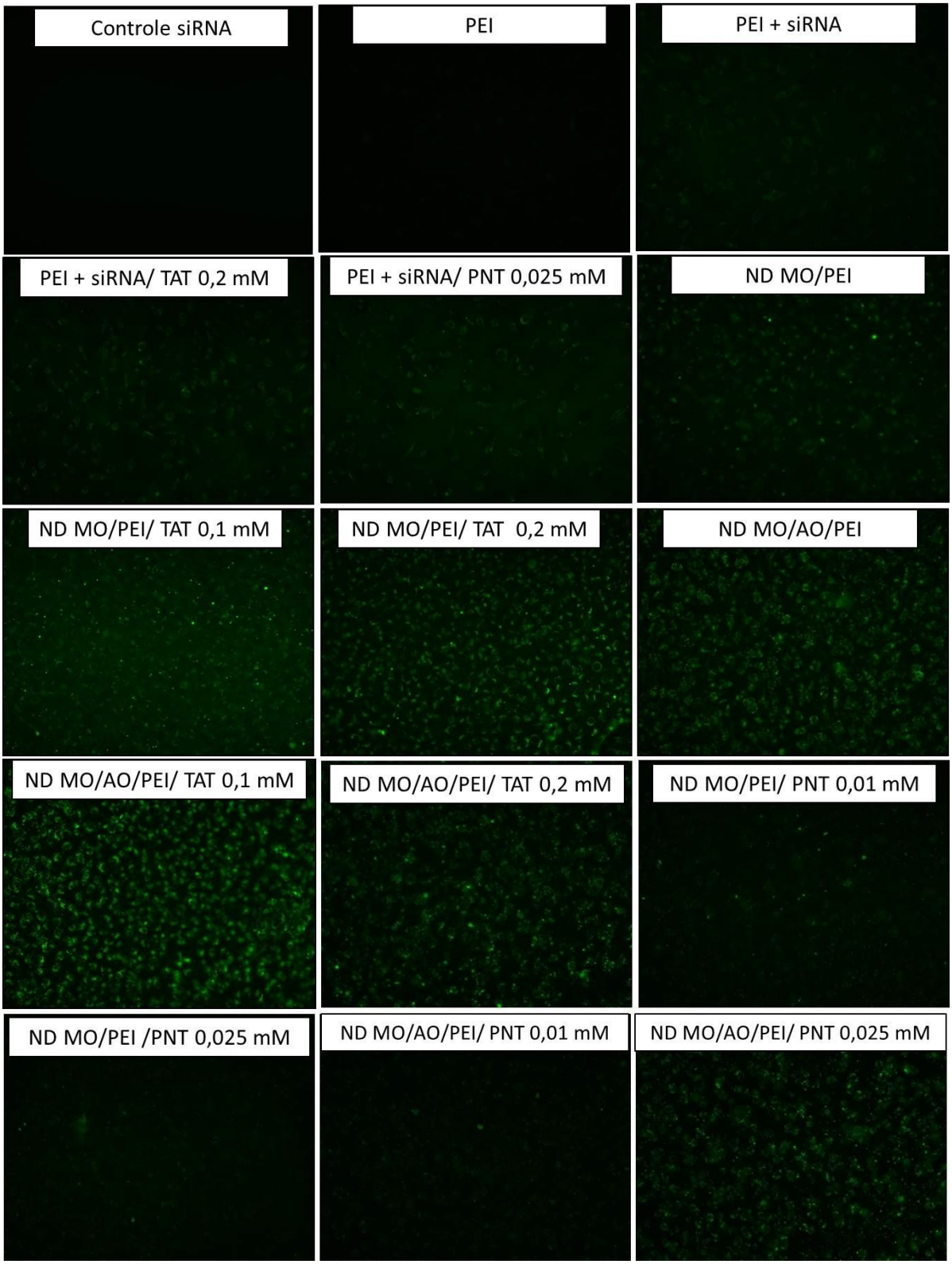

Figura 29. Visualização dos fibroblastos L929 sob aumento de 20 vezes em microscópio de fluorescência (λexc= 500 nm, λem= 535 nm) em presença de diferentes sistemas contendo siRNA, sendo controle siRNA a solução aquosa

contendo siRNA. Todas as preparações contendo siRNA foram obtidas com siRNA-FAM.

Diversos estudos para avaliação da transfecção celular em fibroblastos L929 foram executados e a primeira diferença a ser observada foi com relação à presença/ ausência de PEI em soluções contendo siRNA-FAM. O controle utilizado (solução siRNA-FAM em água DEPC) não revelou nenhuma transfecção, conforme pode ser observado pela total ausência de fluorescência, enquanto que, em presença de 1% PEI, observa-se uma fraca intensidade de fluorescência na imagem (Figura 29, quadro 3). Tal fato pode ser justificado pela capacidade que o polímero catiônico possui em condensar o siRNA, facilitando sua entrada na célula por neutralizar sua carga superficial, o que faz com que esse funcione como um carreador gênico do tipo não-viral já muito estudado e utilizado (XU et al., 2007).

A adição dos PTDs (TAT e PNT) à preparação PEI 1% e siRNA-FAM proporcionou um pequeno aumento da transfecção pois observa-se um ligeiro aumento da intensidade de fluorescência. Diversos estudos dedicam-se a investigar o mecanismo de entrada destes PTDs em células, sendo atualmente a macropinocitose o mecanismo mais aceito para a entrada de TAT, um processo de múltiplas etapas que envolvem a aderência de TAT à superfície da célula, seguido da estimulação da entrada por macropinocitose tanto do TAT como de uma partícula eletricamente carregada, culminando no escape endossomal para o citoplasma (KAPLAN et al., 2005; GUMP et al., 2007). O PNT, por sua vez, é capaz de ser internalizado tanto pela via endocítica como pela via não-endocítica, induzindo a invaginação da membrana, resultando na formação de estruturas tubulares. Este PTD é capaz de induzir separação de fase lamelar e por isso perturba a membrana celular de diversas maneiras, além de aumentar a hidratação desta e sua espessura. Portanto o mecanismo de ação proposto para o PNT é a associação aos grupos cabeça de fosfolipídeos e, dependendo da afinidade entre o PTD e os diferentes fosfolipídeos este pode provocar segregação e espessamento da membrana, permitindo a entrada de moléculas ativas (LAMAZIÈRE et al., 2010).

Com relação aos sistemas nanodispersos estudados, o sistema composto por MO/PEI foi capaz de provocar transfecção celular, que apresentou melhores resultados na presença de TAT, sendo proporcional ao aumento da concentração deste. A observação da dose-dependência do TAT está em concordância com os

obtidos por Kaplan e colaboradores (KAPLAN et al., 2005), os quais demonstraram o aumento da macropinocitose de vermelho neutro de dextran-texas com o aumento da concentração de TAT entre 1-10 µM. Os sistemas MO/AO/PEI apresentaram maior intensidade de fluorescência comparados àqueles sem AO. Tal fato pode ser justificado pelo caráter de promotor de absorção do AO (PIERRE et al., 2006). Nestes sistemas contendo AO, o PNT demonstrou uma maior intensidade de fluorescência somente na maior concentração testada (0,025 mM), o que está de acordo com os estudos de Drin e colaboradores (DRIN et al., 2003), que demonstraram o aumento linear da internalização de PNT a concentrações elevadas deste peptídeo. De todas as formulações testadas as nanodispersões MO/AO/PEI contendo TAT a 0,1 mM foram as que apresentaram melhores resultados na transfecção e, contrariamente ao efeito do PNT, o aumento da concentração de TAT para 0,2 mM não resultou em aumento de fluorescência (transfecção). Entretanto, deve-se considerar as limitações do método (qualitativo) antes de afirmar ou não a dose-dependência no aumento da eficiência de transfecção.

Este experimento evidenciou que sistemas compostos por MO/AO/PEI funcionalizados com TAT foram capazes de propiciar a melhor eficiência de transfecção dentre os sistemas analisados.

Considerando os estudos de transfecção celular por citometria de fluxo (Figura 27) as nanodispersões compostas por MO/AO/PEI foram capazes de transfectar mais de 90% das células. Combinando estes resultados com os de microscopia de fluorescência (Figura 27), os quais indicaram o aumento da intensidade de fluorescência no interior das células (indicativo de transfecção celular) quando se associou TAT ao sistema MO/AO/PEI elegeram-se estas nanodispersões para os estudos *in vivo* de penetração cutânea e eficácia.

4.7 Estudos *in vivo* de penetração e irritação cutânea

Avaliação da penetração cutânea *in vivo* em modelo animal

A estratégia de associação de nanopartículas a PTD vem sendo bastante estudada nos últimos anos. Devido a barreira do estrato córneo diversas estratégias químicas e físicas têm sido utilizadas e a combinação de nanopartículas e PTDs é

uma delas. Diversos estudos na literatura demonstraram que a combinação de nanopartículas e PTDs para a veiculação de fármacos pela pele é capaz de aumentar a penetração cutânea, gerando benefícios do ponto de vista terapêutico (DESAI et al., 2010).

Os PTDs tem a capacidade de carrear compostos lipídicos através da pele. O TAT já foi explorado para diversas aplicações tais como a veiculação de peptídeos, proteínas, ácidos nucléicos, anticorpos, dentre outros (TORCHILIN et al., 2008), entretanto, é inovador a associação de PTDs às nanopartículas de estrutura líquido-cristalina estudadas no presente trabalho.

A Figura 30 ilustra os resultados de penetração cutânea em modelo animal (*hairless mouse),* obtidos para os sistemas desenvolvidos funcionalizados com TAT.

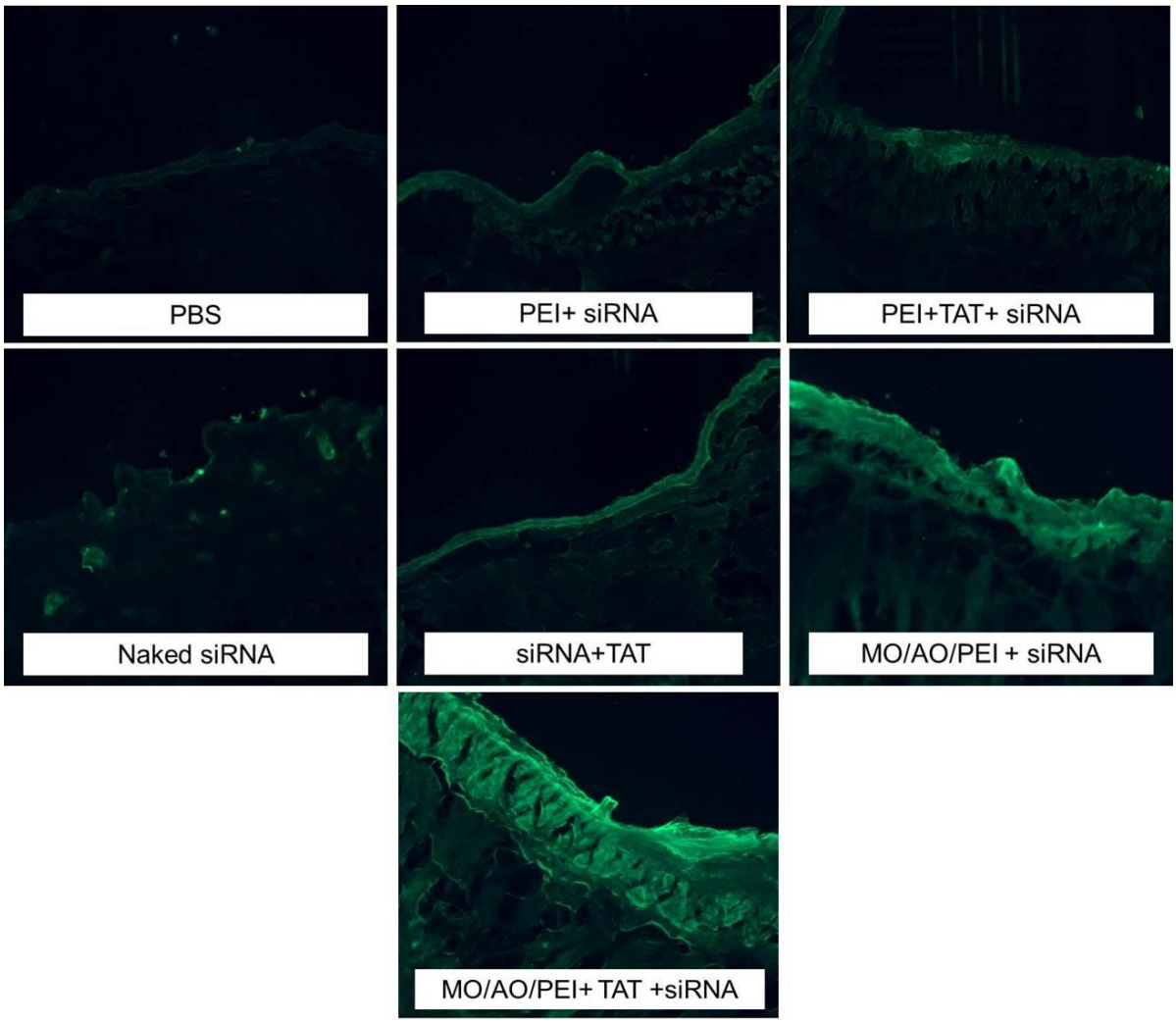

Figura 30. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência em objetiva de 10 vezes (λexc= 500 nm, λem= 535 nm) para cortes histológicos de pele com espessura de 10 μm.

As imagens da Figura 30 demonstram que a presença TAT foi capaz de aumentar a penetração cutânea na presença da nanodispersão MO/AO/PEI e dos controles testados (PEI e solução de siRNA). Tais resultados estão em concordância com resultados de transfecção celular (Figura 27) e demonstram a importância da funcionalização de sistemas líquido cristalinos para o aumento da penetração cutânea.

O potencial de sistemas líquido cristalinos para a veiculação de siRNA na pele proporcionado pelo aumento da retenção cutânea já foi demonstrado em nosso grupo (VICENTINI et al., 2013). Naquela ocasião sistemas compostos por MO/AO/OAM/ fase aquosa (8:2:2:88, p/p/p/p) e MO/OA/PEI/ fase aquosa (8:2:5:85, p/p/p/p) ambos contendo GAPDH siRNA-FAM foram analisados com relação a sua penetração cutânea após 24 e 48 h da aplicação. Estes sistemas haviam demonstrado um aumento da retenção cutânea em relação à formulação controle (solução de siRNA).

Nosso estudo demonstra que um aumento na penetração cutânea pode ser obtido com um menor tempo da aplicação (12 h) e que sistemas compostos por MO/AO/PEI além de proporcionarem uma maior viabilidade celular e taxa de transfecção celular (Figuras 27 e 29, respectivamente), quando funcionalizados com TAT são capazes de penetrar na epiderme viável de maneira muito mais eficiente (Figura 30).

Estudos anteriores demonstram o potencial de TAT para o aumento da penetração cutânea. Lipossomas elásticos conjugados a TAT (EL/TAT) foram estudados por Kang e colaboradores em comparação a um creme convencional (CC/TAT) e lipossomas convencionais (CL). A penetração cutânea *in vitro* foi analisada e obteve-se a seguinte ordem de penetrabilidade: EL/ TAT > EL > CC/TAT ≥ CL > CC, demonstrando que os EL/TAT são sistemas carreadores eficientes para aumentar a penetração cutânea *in vitro* e *in vivo* (KANG et al., 2010; DESAI et al., 2010).

Patlolla e colaboradores (PATLOLLA *et. al.*, 2010) analisaram a habilidade de TAT em translocar nanopartículas lipídicas através da pele. Neste estudo, uma sonda fluorescente foi encapsulada no sistema de liberação e modificações na superfície do sistema foram conduzidas para que este pudesse ter uma maior afinidade por grupos histidina, presentes tanto no TAT como no controle negativo

utilizado, YKA, um peptídeo não transdutor. O sistema funcionalizado com TAT foi capaz de aumentar a penetração cutânea em 120 μM de profundidade na pele, sendo a sonda fluorescente encontrada tanto na epiderme como na derme e folículos pilosos. Ao contrário, as nanopartículas lipídicas não funcionalizadas ou funcionalizadas com o controle negativo YKA permaneceram localizadas no estrato córneo ou folículos. O mecanismo proposto neste estudo indica que a translocação de nanopartículas funcionalizadas com o peptídeo TAT segue uma sequência de eventos. Primeiramente, a carga positiva de TAT auxilia na ligação às células da pele e então a evaporação de água das nanodispersões leva à formação de uma fina camada lipídica oclusiva que facilita sua entrada pelo estrato córneo. A partir daí o TAT é capaz de aumentar a penetração cutânea das nanopartículas nas camadas viáveis da pele.

Com base nos estudos anteriores e no presente estudo conclui-se que TAT é capaz de aumentar o carreamento de lipídicas através da pele e, portanto é uma estratégia interessante para a veiculação de pequenas e de grandes moléculas com pouca penetração cutânea.

4.8 Avaliação *in vivo* da eficácia de siRNA pré-desenhado em modelo animal

Mais importante que carrear siRNA na pele é verificar se este agente vai desempenhar seu papel de supressão da produção de uma proteína específica. Para tanto os estudos de eficácia *in vivo* com siRNA pré-desenhado em modelo animal de processo inflamatório cutâneo foram fundamentais. Nestes experimentos, avaliou-se a capacidade das formulações carreadoras de siRNA em suprimir a produção exacerbada de TNF-α.

A Figura 31 ilustra os resultados obtidos para a análise *in vivo* do desempenho dos sistemas de liberação desenvolvidos na presença de PEI contendo ou não siRNA específico e TAT.

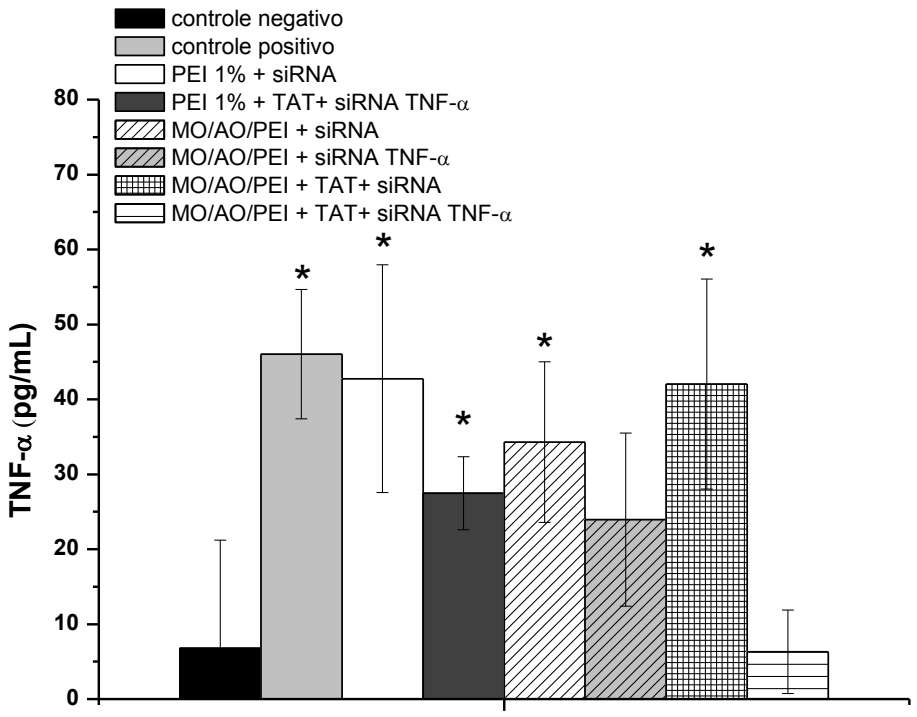

Figura 31. Resultado obtido *in vivo* para as diferentes formulações aplicadas com relação à supressão de TNF-α (Teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney para as amostras comparadas ao controle, $p < 0,05$).

Conforme evidenciado pela Figura 31, com relação ao controle não tratado (pele sem processo inflamatório), houve diferença estatisticamente significativa com relação à concentração de TNF-α para os camundongos tratados com TPA (agente indutor de processo inflamatório), PEI/siRNA TNF-α contendo ou não o PTD TAT, nanodispersão MO/AO/PEI na presença de siRNA padrão ou específico TNF-α e para a nanodispersão MO/AO/PEI na presença de siRNA padrão e funcionalizada com o PTD TAT. Ou seja, estas preparações não foram capazes de inibir a produção de TNF-α. Entretanto, a nanodispersão MO/AO/PEI contendo siRNA TNF-α e funcionalizada com TAT a 0,1 mM apresentou título de TNF-α semelhante ao controle não tratado.

Este resultado corrobora os obtidos anteriormente, ou seja, as nanodispesões MO/AO/PEI funcionalizadas com TAT promovem não só o aumento da transfecção celular e da penetração cutânea *in vivo* do siRNA como também são eficazes na

promoção da supressão de TNF-α em modelo animal de processo inflamatório cutâneo.

Este aumento da penetração cutânea propiciado pelo TAT já foi discutido por Uchida e colaboradores, que demonstraram o aumento da penetração cutânea em função da estabilidade do siRNA frente à RNAseA, quando este foi combinado ao PTD TAT para o tratamento de dermatite atópica quando associado a AT1002, um modulador das *tight junctions,* melhorando a eficácia do siRNA (UCHIDA et al., 2011).

Nosso grupo já demonstrou também a eficácia *in vivo* das nanodispersões e de fase líquido cristalina do tipo hexagonal, quando comparadas à solução de siRNA (VICENTINI et al., 2013). Vicentini e colaboradores utilizaram Western Blot para verificar a supressão da expressão da proteína modelo GADPH em amostras de pele tratadas por 24 h ou 48 h com as nanodispersões MO/AO/PEI e MO/AO/OAM e alcançaram resultados satisfatórios para a supressão de GADPH após 24h com tratamento pela nanodispersão MO/AO/PEI.

Inovativamente, o presente trabalho demostra a capacidade dos sistemas líquido cristalinos nanoestruturados funcionalizados com PTD, em específico com o TAT, para suprimir a expressão de outra proteína, o TNF-α, um importante marcador na psoríase, demonstrando o caráter promissor das nanodispersões compostas por MO/AO/PEI para a terapia tópica antisense de doenças cutâneas de causa genética.

Conclusões

Os estudos realizados no presente projeto permitiram concluir que:

- As soluções contendo os diferentes PTDs foram capazes de neutralizar a carga negativa do siRNA (cerca de -70 mV) e revelaram a completa complexação deste quando utilizaram-se as concentrações de 0,05 mM e 0,5 mM para o PNT e TAT, respectivamente.
- Na caracterização das fases líquido cristalinas por microscopia de luz polarizada e difração de raio X baixo ângulo, as amostras MO/PEI/fase aquosa (10:0,4:89,6, p/p/p) e MO/OAM/fase aquosa (10:1:89, p/p/p) revelaram-se como estruturas em transição cúbica-hexagonal, enquanto que as amostras contendo AO, ou seja, MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/p) e MO/AO/OAM (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p) apresentaram-se numa estrutura de fase líquido cristalina hexagonal. Para todos os sistemas líquido cristalinos analisados a adição de siRNA e PTDs não alterou o parâmetro de rede das formas hexagonal e cúbica, sugerindo que as moléculas foram adsorvidas na superfície das partículas. Os diferentes sistemas contendo os aditivos catiônicos PEI e OAM apresentaram tamanho de partícula na faixa nanométrica (150-350 nm) e potenciais zeta com valores positivos. A complexação do siRNA foi confirmada com as análises por eletroforese em gel de agarose. Esta complexação foi desfeita pelo método da competição com poliânions, propiciando a formação de bandas referentes ao siRNA na análise por eletroforese em gel de agarose mostrando que em meio biológico o siRNA é passível de ser liberado da nanoestrutura, condição importante para sua atividade.
- As análises conjuntas dos resultados para a viabilidade celular por MTT e citometria de fluxo permitiram concluir que os sistemas compostos por MO/PEI, MO/AO/PEI e MO/OAM não foram citotóxicos para as células de fibroblastos L929.
- Os maiores valores para a transfecção de células L929 foram obtidos para o sistema MO/AO/PEI na presença de siRNA e as análises por

microscopia de fluorescência permitiram inferir que o uso do PTD TAT foi vantajoso para o aumento da transfecção celular.

- Os estudos de penetração cutânea *in vivo* demonstraram um aumento da penetração cutânea para o sistema líquido cristalino escolhido (MO/AO/PEI) contendo TAT. Os resultados *in vivo* da análise da eficácia dos sistemas para a supressão de TNF-α demonstraram que o sistema MO/AO/PEI contendo TAT foi capaz de promover a supressão da expressão de TNF-α, igualando-se aos valores obtidos para o grupo controle sem tratamento por meio das análises estatísticas efetuadas ($p<0,05$).
- A funcionalização das nanodispersões de faze hexagonal com o PTD TAT mostrou ser efetiva no melhoramento da performance destes sistemas de liberação na veiculação do siRNA na pele, vislumbrando-se um potencial carreador na terapia antisense tópica para doenças cutâneas de característica inflamatória, como a psoríase.

Referências

Referências

AAGAARD, L.; ROSSI, J.J. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, p. 75-86, 2007.

ALIABADI, H.M.; LANDRY, B.; SUN, C.; TANG, T.; ULUDAG, H. Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: where do we stand?. **Biomaterials**, v. 33, p. 2546-2569, 2012.

ALVES, I.D.; JIAO, C.Y.; AUBRY, S.; AUSSEDAT, B.; BURLINA, F.; CHASSAING, G.; SAGAN, S. Cell biology meets biophysics to unveil the different mechanisms of penetratin internalization in cells. **Biochim Biophys Acta**, v.1798, p. 2231-2239, 2010.

ARTHANARI, Y.; PLUEN, A.; RAJENDRAN, R.; AOJULA, H.; DEMONACOS, C. Delivery of therapeutic shRNA and siRNA by Tat fusion peptide targeting bcr–abl fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells. **J Controlled Release**, v. 145, p. 272-280, 2010.

BEAL, J. Silence is golden:can RNA interference therapeutics deliver? **Drug Discov Today**, v. 10, p. 169-172, 2005.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências-Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre: Artmed Editora, 2ªed, 2002.

BORGES, J.; RIBEIRO, J.A.; PEREIRA, E.M.; CARREIRA, C.A.; PEREIRA, C.M.; SILVA, F. Preparation and characterization of DNA films using oleylamine. **J. Colloid Interface Sci**, v. 358, p. 626-634, 2011.

BRACKE, S.; GEUSENS, B.; DYNOODT, P.; VAN GELE, M.; SPEECKAERT, R.; SCHALKWIJK, J.; TJABRINGA, S.; LAMBERT, J. Synthesis and characterization of nonviral liposomal carriers for the local application of siRNA molecules and anti-miRNAs in the therapeutic treatment of psoriasis. **J. Transl. Med**, v. 9, p. 13, 2011.

BREUNIG, M.; HOZSA, C.; LUNGWITZ, U.; WATANABE, K.; UMEDA, I.; KATO, H.; GOEPFERICH, A. Mechanistic investigation of poly(ethylene imine)-based siRNA delivery: Dissulfide bonds boost intracellular release of the cargo, **J. Controlled Release**, v. 130, p. 57-63, 2008.

BRUNO, K. Using drug-excipient interactions for siRNA delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, p. 1210-1226, 2011.

ClinicalTrials.gov, acesso em 05/01/2013.

CUN, D.; FORGED, C.; YANG, M.; Frøkjær, S.; NIELSEN, H. M. Preparation and characterization of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery. **Int J Pharm**., v. 390, p. 70-75, 2010.

De FOUGEROLLES, A.; MANOHARAN, M.; MEYERS, R.; VORNLOCHER, H. P. RNA interference *in vivo*: toward synthetic inhibitory RNA-based therapeutics. **Methods Enzymol**, v. 392, p. 278-296, 2005.

De FOUGEROLLES, A.; VORNLOCHER, H.P.; MARAGANORE, J.; LIEBERMAN, J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nat Rev Drug Discovery**, v. 6, p. 443-453, 2007

DE PAULA, D.; BENTLEY, M.V.L.B.; MAHATO, R.I. Effect of iNOS and NF-kB gene silencing on b-cell surviral and function. **J Drug Target,** v. 13, p. 358-369, 2007a.

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, 2007b.

DEROSSI, D.; JOLIOT, A.H.; CHASSALING, G.; PROCHIANTZ, A. The third helix of the Antennapaedia homeodomain translocates through biological membranes. **J. Biol. Chem.**, v.269, p. 10444-10450, 1994

DESAI, P.; PATLOLLA, R.R.; SINGH, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Mol. Membr. Biol.**, v. 27, p. 247-259, 2010.

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

DRIN, G.; COTTIN, S.; BLANC, E.; REES, A.R.; TEMSAMANI, J. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. J. Biol. Chem., v. 278, p. 31192–31201, 2003.

DUCHARDT, F.; FOTIN-MLECZEK, M.; SCHWARZ, H.; FISCHER, R.; BROCK, R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. **Traffic**, v. 8, p. 848-866, 2007.

EGUCHI, A.; DOWDY, S. F. siRNA delivery using peptide transduction domains. **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 7, p.341-345, 2009

ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21±nucleotide RNAs mediate RNA interference in culture mammalian cells. **Nature**, v. 411, p. 495-498, 2001.

ENDOH, T.; OHTSUKI, T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. **Adv Drug Delivery Rev**, v. 61, p. 704-709, 2009

FERREIRA, D. A.; BENTLEY, M.V.L.B.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. Cryo-TEM investigation of phase behaviour and aggregate structure in dilute dispersions of monoolein and oleic acid. **Int J Pharm**, v. 310, p. 203-212, 2006.

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

FISICHELLA, M., DABBOUE, H.; BHATTACHARYYA, S.; SABOUNGI, M.L.; SALVELAT, J.P; HEVOR, T. ; GUERIN, M. Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. **Toxicol. In Vitro,** v. 23, p. 697-703, 2009.

FRANKEL, A. D.; PABO, C.O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, **Cell**, v. 55 , p. 1189–1193, 1988.

GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; BURI, P. Monoolein: a review of the pharmaceutical applications. **Drug Dev Ind Pharm**., v. 26, n. 8, p. 809-820, 2000.

GEIL, B.; FEIWEIER, T.; POSPIECH, E.M.; EISENBLATTER, J.; FUJARA, F. Relating structure and translational dynamics in aqueous dispersions of monoolein. **Chem Phys Lipids**, v. 106, p. 115-126, 2000.

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

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

GRAYSON, A.C.; DOODY, A.M.; PUTNAM, D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery *in vitro.* **Pharm Res,** v. 23, p. 1868-1876, 2006.

GREEN, M.; LOEWENSTEIN, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat trans-activator protein, **Cell** , v. 55 , p. 1179–1188, 1988.

GUMP, J.M.; DOWDY, S.F. Tat transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. Trends Mol Med, v. 13, p. 443-448, 2007.

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

GUSTAFSSON, J., LJUSBERG-WAHREN, H., ALMGREN, M., LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic amphiphilic polymer. **Langmuir**, Baltimore, v.13, p.6964-6971, 1997.

HA, H.Y.; KIM, Y.; RYOO, Z.Y.; KIM, T.Y. Inhibition of the TPA-induced cutaneous inflammation and hyperplasia by EC-SOD. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 348, p. 450-458, 2006.

HAFEZ, I. M.; CULLIS, P.R. Roles of lipid polimorphism in intracelular delivery. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 47, n. 2-3, p. 139-148, 2001.

HARDING, C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatol. Ther.**, v.17, p.6-15, 2004.

HVID, H.; TEIGE, I.; KYIST, P.H.; SVENSSON, L.; KEMP, K. TPA induction leads to a Th 17-like response in transgenic K14/VEGF mice: a novel in vivo screening model of psoriasis. **Int. Immunol**., v. 20, p. 1097-1106, 2008.

JASZCZYSZYN, A.; GASIOROWSKI, K. Limitations of the MTT assay in cell viability testing. **Adv. Clin. Exp. Med.**, v. 17, p. 525-529, 2008.

JAKOBSEN, M.M.; STENDERUP, K.K.; ROSADA, C.C.; MOLDT, B.B.; KAMP, S.S.; DAM, T.N.; JENSEN, T.G.; MIKKELSEN, J.G. Amelioration of psoriasis by anti-TNF-alpha RNAi in the xenograft transplantation model. **Mol. Ther.** v. 17, p. 1743-1753, 2009.

JOLIOT, A.; PERNELLE, C.; DEAGOSTINI-BAZIN, H.; PROCHIANTZ, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neutral morphogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 1864-1868, 1991.

JONES, S.W.; CHRISTISON, R.; BUNDELL, K.; VOYCE, C.J.; BROCKBANK, S.M.V.; NEWHAM, P.; LINDSAY, M.A. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 145, p. 1093–1102, 2005.

KANG, J.H.; TACHIBANA, Y.; KAMATA, W.; MAHARA, A.; HARADA-SHIBA, M.; YAMAOKA, T. Liver-targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier. **Bioorg Med Chem**, v. 18, p. 3946-3950, 2010.

KHAFAGY, S.; MORISHITA, M.; IDA, N.; NISHIO, R.; ISOWA, K.; TAKAYAMA. Structural requirements of penetratin absorption enhancement efficiency for insulin delivery. **J. Controlled Release**, v. 143, p. 302-310, 2010.

KAPLAN, I.M.; WADIA, J.S.; DOWDY, S.F. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. J. Co*ntrolled Release*, v. *102, p. 247-253*, 2005.

KAPOOR, M.; BURGESS, D.J.; PATIL, S.D. Psicochemical characterization tecniques for lipid based delivery systems for siRNA. **Int. J. Pharm**, v. 427, p. 35-57, 2012.

KHAFAGY, E.S.; MORISHITA, M.; IDA, N.; NISHIO, R.; ISOWA, K.; TAKAYAMA, K. Structural requirements of penetratin absorption enhancement efficiency for insulin delivery. **J Controlled Release**, v. 143, p. 302-310, 2010.

KIM, S.W. Biomaterials to gene delivery. **J Controlled Release**, v. 155, p. 116-118, 2011.

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

KUNATH, K.; Von HARPE, A.; FISCHER, D.; PETERSEN, H.; BICKEL, U.; VOIGT, K.; KISSEL, T. L ow-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties,transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. **J Controlled Release**, v. 89, p. 113-125, 2003.

LAM, J.K.W; LIANG, W.; CHAN, H.K. Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, p. 1-15, 2012.

LAMAZIÈRE, A.; MANITI, O.; WOLF, C.; LAMBERT, O.; CHASSAING, G.; TRUGNAN, G.; AYALA-SANMARTIN, J. Lipid domain separation, bilayer thickening and pearling induced by the cell penetrating peptide penetratin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1798, p. 2223-2230, 2010.

LARSON, S.D.; JACKSON, L.N.; CHEN, A.; RYCHAHOU, P.G.; EVERS, B.M. Effectiveness of siRNA uptake in target tissues by various delivery methods. **Surgery**, v. 142, p. 262-269, 2007.

LEE, S. K.; KUMAR, P. Conditional RNAi: towards a silent gene therapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, p. 650-664, 2009

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. Controlled Release**, v. 141, 339-346, 2010.

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.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; WACHTEL, E.; SHOHAM, G.; GARTI, N. An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporine A: Physical characterization. **J. Colloid. Interface Sc.i,** v. 308, p. 514-524, 2007.

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

LOPES, L.B.; BROPHY, C.M.; SPARKS, O.; FLYNN, C.R.; FURNISH, E.; JOSHI, L.; PANITCH, A.; KOMALAVILAS, P.; BENTLEY, M.V.L.B. Comparative study on the skin penetration of protein transduction domains and a conjugated peptide. **Pharm. Res.**, v. 22, p. 750-757, 2005.

LOPES, L.B.; FERREIRA, D.A.; PAULA, D.; GARCIA, M.T.J.; THOMAZINI, J.A.; FANTINI, M.C.; 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 permeation. **Pharm. Res.,** v. 23, p. 1332-42, 2006a.

LOPES, L.B.; LOPES, J.L.C.; OLIVEIRA, D.C.R.; THOMAZINE, J.A.; FANTINI, M.C.; COLLETT, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Liquid crystalline phases oof monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of *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.

LOPES, L.B.; FURNISH, E.; KOMALAVILAS, P.; SEAL, B.L.; PANITCH, A.; BENTLEY, M.V.L.B.; BROPHY, C. Enhanced skin penetration of P20

phosphopeptide using protein transduction domains. . **Eur J Pharm Biopham**, v. 68, p. 441-445, 2008.

MA, Z.; LI, J.; HE, F.; WILSON, A.; PITT, B.; LI, S. Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 330, p. 755-759, 2005.

MARTINI, E.; FATTAL, E.; De OLIVEIRA, M.C; TEIXEIRA, H. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. **Int. J. Pharm**, v. 352, p. 280-286, 2008.

MEADE, B.R.; DOWDY, S.F. Enhancing the cellular uptake of siRNA duplexes following noncovalent packaging with protein transduction domain peptides. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, p. 530-536, 2008.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Deliv. Rev**., v.54, p.S3-S17, 2002.

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**., DOI:10.1016/j.ibiod.2012.05.008, 2012 *(In press).*

MÉVEL, M.; KAMALY, N.; CARMONA, S.; OLIVER M.H.; JORGENSEN, M.R.; CROWTHER, C.; SALAZAR, F.H.; MARION, P.L.; FUJINO, M.; NATORI, Y.; THANOU, M.; ARBUTHNOT, P.; YAOUANC, J.J.; JAFFRÈS, P.A.; MILLER, A.D. DODAG: a versatile new cationic lipid that mediates efficient delivery of Pdna and siRNA. **J Controlled Release**, v. 143, p. 222-232, 2010.

http://www.molmed.uni-luebeck.de, acesso em 01/06/2012.

MONTEIRO-RIVIERE, INMAN, A.O.; ZHANG, L.W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 234, p. 222-235, 2009.

MÜLLER-GOYAMANN, 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. 52, p. 103-12, 2004.

NAKANO, M., SUGITA, A., MATSUOKA, H., HANDA, T. Small-angle X-ray scattering and ^{13}C NMR investigation on the internal structure of “cubossomes”. **Langmuir**, v.17, n.13, p.3917-22, 2001.

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. **Plant Cell,** v. 2, p. 279-289, 1990.

NARAYANAN, T. High brilliance small-angle X-ray scattering applied to soft matter. Curr Opin Colloid Interface Sci, v. 14, n. 6, p. 409-415, 2009.

NIMESH, S.; CHANDRA, R. Polyethylenimine nanoparticles as an efficient *in vitro* siRNA delivery system. **Eur J Pharm Biopharm**, v. *73, p. 43-49*, 2009.

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.

PATLOLLA, R.R.; DESAI, P.R.; BELAY, K.; SINGH, M.S. Translocation of cell penetrating peptide engrafted nanoparticles across skin layers. **Biomaterials,** v. 31, p. 5598-5607, 2010.

PEREZ, F.; LLEDO, P.M.; KARAGOGEOS, D.; VINCENT, J.D.; PROCHIANTZ, A.; AYALA, J. Rab3A and Rab 3B carboxy-terminal peptides are

both potent and specific inhibitors of prolactin release by rat cultured anterior pituitary cells. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, p. 1278-1287, 1994.

PIERRE, M.B.R.; RICCI JR, E.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Oleic acid as optimizer of the skin delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. **Pharm. Res.**, v. 230, p. 360-366, 2006.

PRAÇA, F.S.G.; GARCIA, W.S.; PETRILLI, R.; BENTLEY, M.V.L.B. Liquid crystal nanodispersions enable the cutaneous delivery of photosensitizer for topical PDT: fluorescence microscopy study of skin penetration. **Curr. Nanosci.,** v. 8, p. 535-540, 2012.

PRAUSNITZ, M.R.; MITRAGOTRI, S; LANGER, R. Current status amd future potential of transdermal drug delivery. **Nat. Rev. Drug. Discov.,** v.3, p.115-124, 2004.

http://www.pucrs.br, acesso em 24/01/2013.

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.

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. 1323-1330, 2008.

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

SCHROEDER, A.; LEVINS, C.G.; CORTEZ, C.; LANGER, R.; ANDERSON, D.G. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. J. Inter. Med, v. 267, p. 9-21, 2009.

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

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

SIDDIG, M.A.; RADIMAN, S.; MUNIANDY, S.V.; JAN, L.S. Structure of cubic phases in ternary systems Glucopone/water/hydrocarbon. **Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects**, v. 236 , p. 57–67, 2004.

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

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

SOUTSCHEK, J.; AKINC, A.; BRAMLAGE, B.; CHARISSE, K.; CONSTIEN, R.; DONOGHUE, M.; ELBASHIR, S.; GEICK, A.; HADWIGER, P.; HARBORTH, J.; JOHN, M.; KESAVAN, V.; LAVINE, G.; PANDEY, R.K.; RACIE, T.; RAJEEV, K.G.; ROHL, I.; TOUDJARSKA, I.; WANG, G.; WUSCHKO, S.; BUMCROT, D.; KOTELIANSKY, V.; LIMMER, S.; MANOHARAN, M.; VORNLOCHER, H.P. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. **Nature,** v. 432, p. 173-178, 2004.

SUBRIZI, A.; TUOMINEN, E.; BUNKER, A.; RÓG, T.; ANTOPOLSKY, M.; URTTI, A. Tat (48-60) peptide amino acid sequence is not unique in its cell

penetrating properties and cell-surface glycosaminoglycans inhibit its cellular uptake. **J Controlled Release**, v. 158, p. 277-285, 2011.

SUH, M.S.; SHIM, G.; LEE, H.Y.; HAN, S.E.; YU, Y.H.; CHOI, Y.; KIM, K.; KWON, I.C.; WEON, K.Y.; KIM, Y.B.; OH, Y.K. Anionic amino acid-derived cationic lipid for siRNA delivery. **J Controlled Release**, v. 140, p. 268-276, 2009.

SUZUKI, H.; NAKAI, D.; SEITA, T.; SUGIYAMA, Y. Design of a drug delivery system for targeting based on pharmacokinetic consideration. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 19, p. 335-357, 1996.

STEVENSON, M. Dissecting HIV-1 trought RNA interference. **Nat Rev Immunol,** v. 3, p. 851-858, 2003.

TAMURA, A.; OISHI, M.; NAGASAKI, Y. Efficient siRNA delivery based on PEGylated and partially quaternized polyamine nanogels: Enhanced gene silencing activity by the cooperative effect of tertiary and quaternary amino groups in the core. **J Controlled Release**, v. 146, p. 378-387, 2010.

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

THORÉN, P.E.G.; PERSSON, D.; KARLSSON, M.; NORDEN, B. The Antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers the first direct observation. **FBS Letters,** v. 482, p. 265-268, 2000.

TORCHILIN, V.P.; RAMMOHAN, R.; WEISSIG, V.; LEVCHENKO, T.S. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 15, p. 8796-9791, 2001.

TORCHILIN, V.P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, p. 548-558, 2008.

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.

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 esters derivates and m-THPC in photodynamic therapy (PDT). **J Photochem Photobiol B**, v. 70, n. 1, p.1-6, 2003.

UCHIDA, T.; KANAZAWA, T.; TAKASHIMA, Y.; OKADA, H. Development of na eficiente transdermal delivery system of small interfering RNA using functional peptides, Tat and AT-1002. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 59, p. 196-201, 2011.

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

VICENTINI, F.T.M.C.; BORGHETI, L.N.; DEPIERI, L.V.; MANO, D.M.; ABELHA, T.F.; PETRILLI, R.; BENTLEY, M.V.L.B. Delivery systems and local administration routes for therapeutic siRNA. **Pharm. Res.,** doi 10.1007/s11095-013-0971-1, 2013b (*In press*).

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.

XIE, F.Y.; WOODLE, M.C.; LU, P.Y. Harnessing *in vivo* siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. **Drug Discov Today**, v. 11, p. 67– 73, 2006.

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.

WANG, A.H.; CHEN, C.P.; CHAN, M.H.; CHANG, M.; HOU, Y.W.; CHEN, H.H.; HSU, H.R.; LIU, K.; LEE, H.J. Arginine-rich intracellular delivery peptides noncovalently transport protein into living cells. **Biochem Biol Res Commun**, v. 346, p. 758–767, 2006.

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

WELSMAN, S.; HIRSCH-LEMER, D.; BARENHOLZ, Y.; TALMON, Y. Nanostructure of cationic lipid oligonucleotide complexes. **Biophys. J,** v.87, p.609-614, 2004.

WERTH, S.; URBAN-KLEIN, B.; DAI, L.; HÖBEL, S.; GRZELINSKI, M.; BAKOWSKY, U.; CZUBAYKO, F.; AIGNER, A. A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes. **J Control. Release**, v. 112, p. 257-270, 2006.

WEYERMANN,J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **Int. J. Pharm.**, v. 288, p. 369-376, 2005.

WHITEHEAD, J.; Langer, R.; ANDERSON, D.G.. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nat. Rev. Drug Discov.,** v. 8, p. 129-138, 2009.

WINTER, R. Synchrotron X-ray and neutron small-angle scattering of lyotropic lipid mesophases, model biomembranes and proteins in solution at high pressure. **Biochim Biophys Acta, Proteins Proteomics,** v. 1595, p.160-84, 2002.

ZHANG, C.; TANG, N.; LIU, X.J.; LIANG, W.; XU, W.; TORCHILIN, V.P. siRNA-containing liposomes modified with polyarginine effectively silence the targeted gene. **J Controlled Release**, v. 112, p. 229-239, 2006.

ZHANG, Y.; CRISTOFARO, P.; SILBERMANN, R.; PUSCH, O.; BODEN, D.; KONKIN, T.; HOVANESIAN, V.; MONFILS, P.R.; RESNICK, M.; MOSS, S.F.; RAMRATNAM, B. Engineering mucosal RNA interference in vivo. **Mol Ther**, v. 14, p. 336–342, 2006.

ZHU, C.; JUNG, S.; LUO, S.; MENG, F.; ZHU, X.; PARK, T.G.; ZHONG, Z. Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA–PCL–PDMAEMA triblock copolymers. **Biomaterials**, v. 31, p. 2408-2416, 2010.

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

Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
***Campus* de Ribeirão Preto**
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1374.53.6), intitulado "Nanopartículas de Fase Líquido Cristialina Hexagonal Funcionalizadas com Peptídeos de Transdução para Veiculação de siRNA na Terapia de Doenças Tópicas", de autoria de **Raquel Petrilli** e de **Maria Vitória Lopes Badra Bentley,** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05.11.2012.

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1374.53.6), entitled: "Nanopartículas de Fase Líquido Cristialina Hexagonal Funcionalizadas com Peptídeos de Transdução para Veiculação de siRNA na Terapia de Doenças Tópicas", by **Raquel Petrilli** and **Maria Vitória Lopes Badra Bentley,** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, November 5, 2012.

Ribeirão Preto, 13 de novembro de 2012.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964