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

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.

PETRILLI, R.

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

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

_	_	_		
Rac	wel	Pe	tril	li

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 següência 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.

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	Vİ
Lista de abreviaturas e siglas	Vİİ
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	
1.4.2 Polímeros catiônicos	
1.4.3 Peptídeos de transdução de membrana	11
1.5 Sistemas de liberação: os cristais líquidos	13
1.6 Via cutânea para siRNA e usos da terapia cutânea com siRNA	17
1.6.1 Psoríase	
5. CONCLUSÕES	78
6. REFERÊNCIAS	81
7. ANEXOS	98

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).

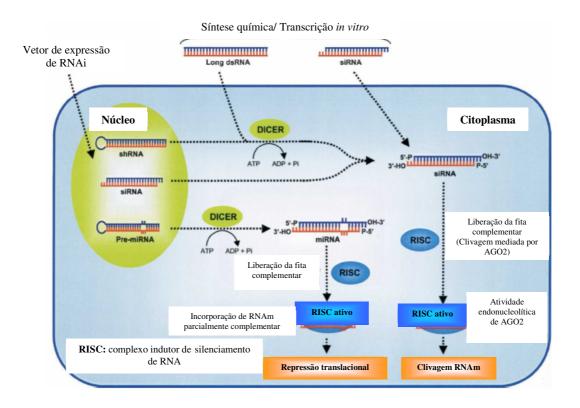


Figura 2: Mecanismo de interferência de RNA. Adaptado de De PAULA et al., (2007b).

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

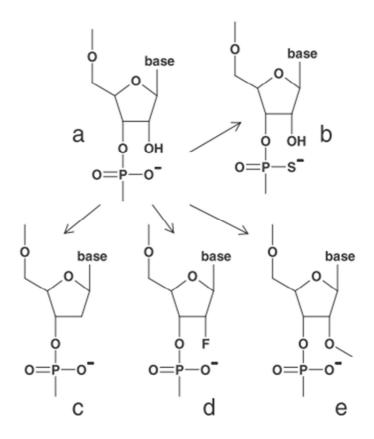


Figura 3. Modificações químicas para a estabilização de siRNA: a) fosfodiéster; b) fosforotionato RNA; c) 2'-deóxi-RNA; d) 2'-deóxi-2'-fluoro (2'F-) RNA; e) 2'-O-metil (2'-O-Me) RNA (BRUNO, 2011)

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.

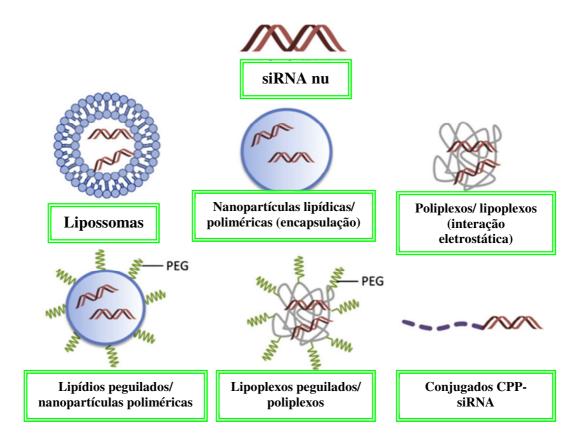


Figura 4. Ilustração esquemática de diferentes métodos não-virais comumente utilizados para carrear siRNAs (Adaptado de LAM et al., 2012).

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).

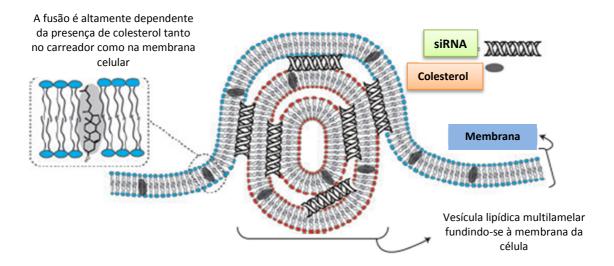


Figura 5. Ilustração esquemática da endocitose de um lipoplexo contendo siRNA (Adaptado de SCHROEDER et al., 2009).

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).

$$\begin{array}{ccc} & \mathsf{H} & \mathsf{H} \\ & \searrow & \\ \mathsf{NH_2CH_2(CH_2)_6CH_2} & \mathsf{CH_2(CH_2)_6CH_3} \end{array}$$

Figura 6. Estrutura guímica 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 alterados, 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).

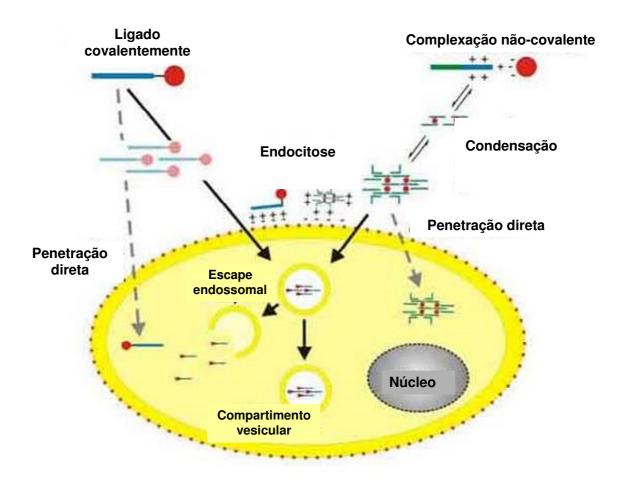


Figura 8. Ilustração esquemática da entrada de peptídeos de transdução de membrana na célula (Adaptado de http://www.molmed.uni-luebeck.de)

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-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Lys-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).

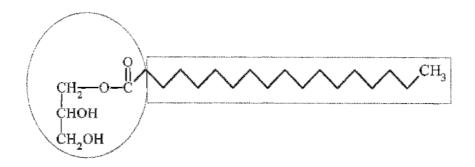


Figura 9: Estrutura química da MO (GANEM-QUINTANAR et al., 2000).

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:

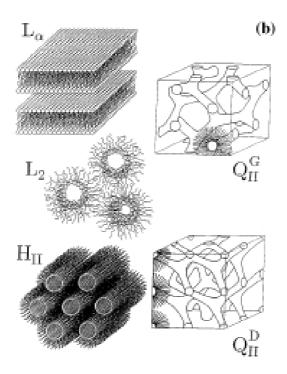


Figura 10: Estrutura de diversas fases líquido-cristalinas formadas pelo sistema binário MO:Água. L_{α} , Fase Lamelar; L2, Fase Micelar Reversa; HII, Fase Hexagonal Reversa; QIIG, Fase Cúbica Giróide; QIID, Fase Cúbica Diamante. Adaptado de GEIL et al. (2000).

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.

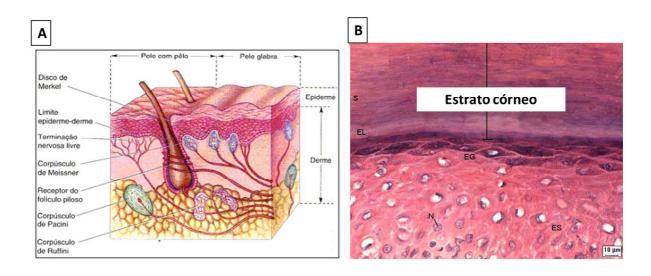


Figura 11: (A) Estrutura esquemática da pele (BEAR et al., 2002) e (B) Destaque para o estrato córneo (Adaptado de http://www.pucrs.br).

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 núcleocitoplasmática 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.

Objetívos

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 cúbicahexagonal, enquanto que as amostras contendo AO, ou seja, MO/AO/PEI/fase aquosa (8:2:1:89, p/p/p/pMO/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

Conclusões

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, vislumbrandose um potencial carreador na terapia antisense tópica para doenças
 cutâneas de característica inflamatória, como a psoríase.

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 ¹³C 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. Monomethoxy-poly(3-hydroxybutyrate)-graft-hyper-branched polyethylenimine copolymers for siRNA delivery. **Biomaterials**, v. 33, p. 2334-2344, 2012.

Anexos



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