UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistemas de liberação de geleificação *in situ* para veiculação de
siRNA: desenvolvimento, caracterização e estudos *in vitro* e
in vivo em modelo animal**

Lívia Neves Borgheti Cardoso

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistemas de liberação de geleificação *in situ* para veiculação de
siRNA: desenvolvimento, caracterização e estudos *in vitro* e
in vivo em modelo animal**

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: Livia Neves Borgheti Cardoso

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Vitória
Lopes Badra Bentley

Ribeirão Preto
2012

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

Borgheti-Cardoso, Livia Neves

Sistemas de liberação de geleificação *in situ* para veiculação de siRNA: desenvolvimento, caracterização e estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal. Ribeirão Preto, 2012.

107 p.; 30cm.

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

Orientadora: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

1. siRNA. 2. *In situ* gelling. 3. Cristal Líquido.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lívia Neves Borgheti Cardoso

Sistemas de liberação de geleificação *in situ* para veiculação de siRNA: desenvolvimento, caracterização e estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal.

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: Prof.^a Dr.^a Maria Vitória
Lopes Badra Bentley

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus pela vida e por guiar meus passos a todo instante.

Aos meus pais, Claudio e Alice, pelo exemplo de vida pessoal e profissional, pelo carinho e apoio incondicional. Obrigada pelas abdições que fizeram para que os meus sonhos pudessem se realizar e por sempre me incentivarem a prosseguir.

As palavras sempre ficam pequenas para expressar todo amor e orgulho que tenho de vocês.

Ao meu marido e grande amigo Pedro, pelas discussões científicas, auxílio incondicional e carinho com que incentivou o meu mestrado e apoia meus ideais. Obrigada pelo amor, carinho, companheirismo e acima de tudo por tornar minha vida mais feliz a cada dia.

“Amo como ama o amor. Não conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te é que te amo?”

Fernando Pessoa

As minhas irmãs Lais e Larissa, pelo apoio e por todo amor e alegria que trazem à minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, pelo exemplo profissional e pessoal e pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pela dedicação, confiança e amizade empregada na minha formação.

À minha amiga Dr^a. Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini, a quem guardo profunda admiração! Obrigada pela constante colaboração, pelas sugestões e críticas durante a realização do meu trabalho e por ter compartilhado comigo toda sua experiência científica e pessoal e por me encorajar a continuar sempre lutando. Muito obrigada por sua amizade!

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você”. Ralph Waldo Emerson

A minha amiga e companheira de laboratório Lívia Depieri, pela amizade, companheirismo e dedicação com que me ajudou tantas vezes na execução de experimentos e discussões científicas.

Aos amigos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Samantha, Marina, Danielle, Thais, Josimar, Raquel, Wanessa, Patrícia, Érica, Juliana e Mayara pelo carinho e por me permitirem crescer cientificamente e pessoalmente.

Aos amigos e técnicos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Henrique, José Orestes e Fabíola, pela dedicação com que nos ajudam e por manterem a ordem do laboratório, facilitando a realização dos experimentos. Em especial ao Henrique, que muito me auxiliou na realização do experimento *in vivo* e com as fotografias desta dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Carvalho de Abreu Fantini pela colaboração e pela disponibilidade na execução das análises de SAXS e de me ensinar a interpretar os dados. E principalmente por me mostrar o prazer de fazer ciência. Ao Laboratório

Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, Brasil, que nos possibilitou a realização das análises do SAXS.

À Prof^a. Dr^a. Mamie Mizusaki Iyomasa por permitir-me utilizar os equipamentos de seu laboratório, pelas análises histológicas e pela colaboração na discussão dos estudos de toxicidade *in vivo*. E ao Ricardo pelo auxílio nas análises histológicas.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura por permitir-me utilizar os equipamentos de seu laboratório e a todos os pós-graduandos e funcionários do seu laboratório que sempre me auxiliaram no que foi preciso.

À Prof^a. Dr^a. Marilisa Lara Guimarães pelas discussões sobre cristais líquidos.

Ao pessoal do Biotério da FCFRP-USP, Reinaldo, Ronaldo, Lucas e Daniel pela ajuda com os camundongos e por colaborar com meus experimentos *in vivo*.

Aos meus avós, José, Maria, Benedito e Iraci pelo amor, orações e por torcerem sempre por mim.

As minhas amigas Fernanda, Lenita, Paty, Helen, Karina e Tais por tudo que já vivemos juntas e por saber que sempre posso contar com vocês. Saudades!

Aos meus casais de amigos Raquel, Helder, Joana e Luis Eduardo pelos bons momentos compartilhados e pela amizade.

Aos meus sogros Raimundo e Vânia por rezarem muito por mim e por terem me acolhido com tanto afeto e carinho

Aos meus cunhados Aline, Lucas, Gilberto e Mariana por todo apoio.

Aos meus sobrinhos João e Mateus por toda alegria que trazem a minha vida.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, Eleni, Rosana e Rafael, pelo excelente serviço prestado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº. 2010/11736-0).

À todos aqueles que, de alguma forma, participaram da execução deste trabalho, tornando possível sua realização.

***"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.
Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança."
Albert Einstein***

RESUMO

BORGHETI-CARDOSO, L. N. **Sistemas de liberação de geleificação *in situ* para veiculação de siRNA: desenvolvimento, caracterização e estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal**. 2012. 107f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A comprovação de que siRNA pode ser usado para supressão de genes em diferentes células de mamíferos atraiu grande atenção como nova possibilidade de tratamento para diversas doenças. No entanto, para aplicação terapêutica de siRNA é necessário o desenvolvimento de um sistema de liberação efetivo e não tóxico, que permita a captação celular do siRNA e também que evite a sua degradação por enzimas. A capacidade de supressão de genes promovido pelo siRNA depende tanto do número de moléculas de siRNA transfectadas quanto da taxa de duplicação da célula. Uma das formas farmacêuticas que vem sendo amplamente utilizadas na literatura com o objetivo de prolongar e proteger a liberação de fármacos são as formulações com capacidade de formação de gel *in situ*. Desta forma, a presente pesquisa teve por objetivo o desenvolvimento farmacotécnico de formulações líquido cristalinas com formação de gel *in situ* após administração por via subcutânea para veiculação sustentada de siRNA. Misturas adequadas de monoleína, propilenoglicol, tampão Tris e polietilenoimina ou oleilamina (polímero e lipídeo catiônico, respectivamente) formaram sistemas precursores capazes de se geleificar *in situ* com excesso de água e, como demonstrado pelo estudo de absorção de água, a formação do gel é um processo rápido. As formulações desenvolvidas também foram eficientes para complexar o siRNA comprovando a importância da incorporação dos aditivos catiônicos aos sistemas. A liberação *in vitro* dos sistemas líquido cristalinos mostraram que a liberação é dependente da taxa de absorção de água e os estudos *in vivo* em modelo animal para avaliação da formação do gel *in situ* e toxicidade demonstraram que o gel se forma *in vivo* com a absorção de água dos fluidos corporais, sendo biodegradável e biocompatível. Os sistemas desenvolvidos mostraram-se promissores para o tratamento de doenças onde a administração localizada e sustentada de siRNA é necessária.

Palavras-chave: siRNA, terapia gênica, geleificação *in situ*, cristais líquidos, administração subcutânea.

ABSTRACT

BORGHETI-CARDOSO, L. N. ***In situ* gelling delivery systems for siRNA: development, characterization and studies *in vitro* and *in vivo* in animal model.** 2012. 107f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The evidence that siRNA can be used for suppression of genes in different mammalian cells attracted wide attention as a new possibility of treatment for various diseases. However, for siRNA therapeutic application is necessary to develop an effective non-toxic delivery system, which facilitate the siRNA cell uptake and avoid its degradation by enzymes. The genes suppression promoted by siRNA depends on the number of siRNA molecules transfected as the cell replication rate. One of the dosage forms that have been widely used in literature in order to prolong and protect the drug release is the *in situ* gelling formulations. Thus, the present study aimed the development and characterization of the *in situ* gelling liquid crystal-based systems for subcutaneous application of siRNA in gene therapy. Appropriate mixtures of monoolein, propylene glycol, Tris buffer and polyethyleneimine or oleylamine (cationic polymer and lipid, respectively) was able to form precursor formulation that gelling in water excess and, as demonstrated by the swelling studies, the gel formation is a fast process. The developed formulations were also effective for complexing the siRNA, indicating the importance of the incorporation of cationic additives in the systems. The *in vitro* release study showed that the release is dependent on the water absorption rate. *In vivo* studies in animal models have shown the gel is formed *in vivo* after water uptake of body fluids, and it is biodegradable and biocompatible. The systems developed are promising for the treatment of diseases where the local and sustained administration of siRNA is necessary.

Keywords: siRNA, gene therapy, *in situ* gelling, liquid crystals, subcutaneous route.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de interferência de RNA. Adaptado de SIFUENTES-ROMERO, <i>et al.</i> (2011).	4
Figura 2: Estrutura molecular do polímero catiônico PEI. Adaptado de DE <i>et al.</i> (2009).	7
Figura 3: Estrutura molecular do lipídeo catiônico OAM (MARTINI <i>et al.</i> , 2008).	8
Figura 4: Estrutura química da MO (KULKARNI <i>et al.</i> , 2011).	11
Figura 5: Estruturas líquido cristalinas formadas dependendo do parâmetro de empacotamento, teor de água e temperatura. Adaptado de BORNÉ <i>et al.</i> , (2001). 13	
Figura 6: Suporte dos géis para análise por difração de raios X. (A) Suporte com Kapton e gel (indicado pela seta). (B) Kapton.	25
Figura 7: Placa de 12 poços com insert para avaliação do perfil de liberação do siRNA <i>in vitro</i>	26
Figura 8: Diagramas de fases ternários MO/PG/tampão Tris. Visualização das misturas ao microscópio de luz polarizada após 24 horas e 7 dias, na temperatura ambiente e aumento de 200x.	30
Figura 9: Diagramas de fases ternários: (A) MO/PEI (12:1)/PG/tampão Tris, (B) MO/PEI (6:1)/PG/tampão Tris e (C) MO/PEI (3:1)/PG/tampão Tris. Visualização das misturas ao microscópio de luz polarizada após 24 horas e 7 dias, na temperatura ambiente e aumento de 200x.	31
Figura 10: Diagramas de fases ternários: (A) MO/OAM (24:1)/PG/tampão Tris, (B) MO/OAM (12:1)/PG/tampão Tris. Visualização das misturas ao microscópio de luz polarizada após 24 horas e 7 dias, na temperatura ambiente e aumento de 200x. ..	32
Figura 11: Caracterização dos géis obtidos a partir das formulações precursoras: (A) MO/PG/tampão Tris; (B e C) MO/PEI (12:1)/PG/tampão Tris; (D e E) MO/PEI (6:1)/PG/tampão Tris; (F) MO/PEI (3:1)/PG/tampão Tris, (G e H) MO/OAM (24:1)/PG/tampão Tris e (I) MO/OAM (12:1)/PG/tampão Tris. A caracterização dos géis em A, F e I são as obtidas em 24 horas e 7 dias.	36
Figura 12: Fotomicrografias por microscopia de luz polarizada dos géis obtidos a partir das formulações precursoras: MO/PG/tampão Tris 27:63:10 (p/p/p), MO/PEI/PG/tampão Tris 6,46:0,54:63:30 e 23,54:1,96:59,5:15 (p/p/p/p) e MO/OAM/PG/tampão Tris 8,16:0,34:76,5:15 (p/p/p/p) nos tempos de 24 horas e 7 dias. (A, B e C) Fase cúbica; (D, E, G e H) Fase hexagonal e (F) Emulsão. Aumento 200x.	37

- Figura 13:** Eficiência de complexação das formulações precursoras MO/PG/tampão Tris (controle) e MO/PEI/PG/tampão Tris sem e com siRNA na concentração final de 10 μ M. Controle: 10 μ M de siRNA em água DEPC.40
- Figura 14:** Eficiência de complexação das formulações precursoras MO/PG/tampão Tris (controle) e MO/OAM/PG/tampão Tris sem e com siRNA na concentração final de 10 μ M. Controle: 10 μ M de siRNA em água DEPC.41
- Figura 15:** Formulações selecionadas para a continuidade dos estudos.42
- Figura 16:** Absorção de água pela membrana de diálises com diferentes formulações com PEI em função do tempo. (A) Durante todo o intervalo de tempo avaliado. (B) Durante as duas primeiras horas. * $p < 0,05$ (t-test) ($n=5$, $\pm$ E.P.M.). Parâmetros da cinética de intumescimento: W_0 (g de água absorvida / g de formulação x hora); W_∞ (g de água absorvida / g de formulação).44
- Figura 17:** Absorção de água pela membrana de diálises com diferentes formulações com OAM em função do tempo. (A) Durante todo o intervalo de tempo avaliado. (B) Durante as duas primeiras horas. * $p < 0,05$ (t-test) ($n=5$, $\pm$ E.P.M.). Parâmetros da cinética de intumescimento: W_0 (g de água absorvida / g de formulação x hora); W_∞ (g de água absorvida / g de formulação).45
- Figura 18:** Cinética de intumescimento de diferentes formulações com PEI e seus controles, t/W versus tempo (Cinética de segunda ordem) e $\ln W_\infty / (W_\infty - W)$ versus tempo (Cinética de primeira ordem).47
- Figura 19:** Cinética de intumescimento de diferentes formulações com OAM e seus controles, t/W versus tempo (Cinética de segunda ordem) e $\ln W_\infty / (W_\infty - W)$ versus tempo (Cinética de primeira ordem).48
- Figura 20:** Eficiência de complexação de diferentes formulações precursoras (A) MO/PEI/PG/tampão Tris e (B) MO/OAM/PG/tampão Tris. Controle: 10 μ M de siRNA em água DEPC.50
- Figura 21:** Ensaio de descomplexação do siRNA das formulações precursoras usando heparina. Controle: siRNA 10 μ M em água DEPC. Hep.: heparina.53
- Figura 22:** Absorção de água pela membrana de diálises com diferentes formulações em função do tempo. (A) Durante todo o intervalo de tempo avaliado. (B) Durante as duas primeiras horas. * $p < 0,05$ (t-test) ($n=5$, $\pm$ E.P.M.). Parâmetros da cinética de intumescimento: W_0 (taxa inicial de absorção (g de água absorvida / g de formulação x hora)); W_∞ (absorção máxima de água (g de água absorvida / g de formulação)).54
- Figura 23:** Cinética de intumescimento de diferentes formulações com PEI e seus controles, t/W versus tempo (Cinética de segunda ordem) e $\ln W_\infty / (W_\infty - W)$ versus tempo (Cinética de primeira ordem).55
- Figura 24:** SAXS dos géis obtidos a partir de formulações precursoras de MO/PG/tampão Tris e MO/PEI/PG/tampão Tris sem e com a adição de 10 μ M siRNA.56

Figura 25: SAXS dos géis obtidos a partir de formulações precursoras de MO/PG/tampão Tris e MO/OAM/PG/tampão Tris sem e com a adição de 10 μ M siRNA.57

Figura 26: Liberação do siRNA de diferentes formulações, nos tempos de 48 horas e 7, 14, 21 e 30 dias.65

Figura 27: Formação do gel *in vivo*. (A) Formulação precursora injetada subcutaneamente. (B) Localização do gel formado *in vivo* em camundongo BALB/c. (C) Corte histológico da pele com gel após coloração em H&E.68

Figura 28: Cinética de geleificação da formulação MO/OAM/PG/tampão Tris 16,32:0,68:68:15 (p/p/p/p) administrada por via subcutânea em camundongos BALB/c, 24, 48, 72 horas e 7, 14 e 30 dias após a administração. A formação do gel está indicada pelas setas.69

Figura 29: Cortes histológicos da pele corados em H&E. (A) Células degeneradas em torno do gel, com infiltrado de polimorfonucleares - após 48 horas da administração da formulação precursora MO/PG/tampão Tris 7,85:76,5:15,65 (p/p/p). (B) Hipoderme com macrófagos (seta) - após 7 dias da administração da formulação precursora MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:1,31:68:15 (p/p/p/p). (C) Presença de eosinófilos (setas) no tecido em torno do gel - após 24 horas da administração da formulação precursora MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:1,31:68:15 (p/p/p/p). (D) Fibras colágenas e fibroblastos - após 14 dias da administração da formulação precursora MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,065:76,5:15,585 (p/p/p/p). (E) Fibras musculares integras – após 24 horas da administração de salina com siRNA (10 μ M). (F) Fibras musculares degeneradas – após 48 horas da administração de MO/OAM/PG/tampão Tris 16,32:0,68:68:15 (p/p/p/p). Aumento 400x.72

Figura 30: Corte histológico da pele com gel após coloração em H&E. (A) Gel formado a partir da formulação MO/OAM 8,16:0,34, 48 horas após a injeção. (B) Gel formado a partir da formulação MO/OAM 16,32:0,68, 48 horas após a injeção.74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características do gel formado a partir de formulações de MO/PEI/PG/tampão Tris com excesso de água, determinada por microscopia de luz polarizada em 24, 48, 72 horas e 7, 10 e 14 dias a temperatura ambiente.....	38
Tabela 2: Características do gel formado a partir de formulações de MO/OAM/PG/tampão Tris com excesso de água, determinada por microscopia de luz polarizada em 24, 48, 72 horas e 7, 10 e 14 dias a temperatura ambiente.	39
Tabela 3: Características do gel formado a partir de formulações de MO/PEI/PG/tampão Tris com excesso de água, determinada por microscopia de luz polarizada em 24, 48, 72 horas e 7, 10 e 14 dias a temperatura ambiente.....	51
Tabela 4: Razões entre as distâncias interplanares e tipo de estrutura líquido cristalina (LINDBLOM; RILFORS, 1989).	58
Tabela 5: Vetor de espalhamento, distâncias interplanares, média do parâmetro de rede e estruturas líquido cristalinas determinadas por SAXS dos géis obtidos a partir de formulações precursoras de MO/PG/tampão Tris e MO/PEI/PG/tampão Tris sem e com a adição de 10 μ M siRNA.	58
Tabela 6: Vetor de espalhamento, distâncias interplanares, média do parâmetro de rede e estruturas líquido-cristalinas determinadas por SAXS dos géis obtidos a partir de formulações precursoras de MO/PG/tampão Tris e MO/OAM/PG/tampão Tris sem e com a adição de 10 μ M siRNA.	61
Tabela 7: Resultado da avaliação histológica dos cortes de pele com gel e tecidos adjacentes corados em H&E das formulações com MO 7,85.	70
Tabela 8: Resultado da avaliação histológica dos cortes de pele com gel e tecidos adjacentes corados em H&E das formulações com MO 15,69.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MO	Monoleína, monoleato de glicerina
PG	Propilenoglicol
PEI	Polietilenoimina
OAM	Oleilamina
RNAi	Interferência de RNA
siRNA	Small interfering RNA
RNA _m	RNA mensageiro
dsRNA	RNA dupla fita
miRNA	Micro-RNA
Pri-miRNA	Micro-RNA primário
Pré-miRNA	Micro-RNA precursor
RISC	RNA Induced silencing complex
Ago-2	Argonauta-2
TAE	Tris-acetato-EDTA
DEPC	Dietilpirocarbonato
k	Fator de empacotamento
V _h	Volume da cauda hidrocarbonada
A _o	Área da cabeça polar
L _c	Comprimento do anfifílico
W	Absorção de água no tempo t
W _∞	Máximo de água absorvida
W _o	Taxa inicial de absorção de água
E.P.M.	Erro padrão médio
SAXS	Espalhamento de raios X a baixo ângulo
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	vi
Lista de abreviaturas e siglas.....	vii
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
1.1. Terapia Gênica – Interferência de RNA (RNAi).....	2
1.2. Sistemas de liberação e vias de administração para veiculação de siRNAs..	5
1.3. Sistemas de liberação sustentada - Cristais Líquidos.....	9
 2. OBJETIVOS.....	 15
2.1 Objetivos específicos.....	16
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 18
3.1 Material.....	19
3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas.....	19
3.1.2. Equipamentos e acessórios.....	19
3.2. Métodos.....	20
3.2.1. Desenvolvimento de formulações líquidas precursoras de sistemas líquido cristalinos baseados em MO e incorporados de PEI ou OAM com capacidade de formação de gel <i>in situ</i>	20
3.2.1.1. Obtenção e caracterização por microscopia de luz polarizada das formulações.....	20
3.2.1.1.1. Diagramas ternários.....	20
3.2.1.1.2. Caracterização dos sistemas obtidos por microscopia de luz polarizada.....	20
3.2.1.2. Avaliação <i>in vitro</i> da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água.....	21
3.2.1.3. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionadas.....	21
3.2.1.3.1. Preparo do gel de agarose 2 %.....	21
3.2.1.3.2. Preparo das amostras.....	21
3.2.1.4. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas.....	22
3.2.2. Otimização dos sistemas obtidos para a administração subcutânea de siRNA	23
3.2.2.1. Adequação das formulações com capacidade de formação de gel <i>in situ</i>	23
3.2.2.2. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionada.....	23

3.2.2.3. Avaliação <i>in vitro</i> da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água.....	23
3.2.2.4. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado nas formulações precursoras selecionadas.....	23
3.2.2.5. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas.....	24
3.2.2.6. Caracterização dos géis obtidos após o intumescimento por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	24
3.2.2.7. Avaliação do perfil de liberação do siRNA <i>in vitro</i>	25
3.2.2.8. Avaliação da formação de gel <i>in situ</i> em modelo animal.....	26
3.2.2.9. Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> em modelo animal.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Desenvolvimento de formulações líquidas precursoras de sistemas líquido cristalinos baseados em MO e incorporados de PEI ou OAM com capacidade de formação de gel <i>in situ</i>	29
4.1.1. Obtenção e caracterização por microscopia de luz polarizada das formulações.....	29
4.1.2. Avaliação <i>in vitro</i> da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água.....	34
4.1.3. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionadas.....	39
4.1.4. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas.....	42
4.2. Otimização dos sistemas obtidos para a administração subcutânea de siRNA	49
4.2.1. Adequação das formulações com capacidade de formação de gel <i>in situ</i> ...	49
4.2.2. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionada.....	50
4.2.3. Avaliação <i>in vitro</i> da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água.....	51
4.2.4. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado nas formulações selecionadas.....	52
4.2.5. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas.....	53
4.2.6. Caracterização dos géis obtidos após o intumescimento por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	55
4.2.7. Avaliação do perfil de liberação do siRNA <i>in vitro</i>	64
4.2.8. Avaliação da formação de gel <i>in situ</i> em modelo animal.....	67
4.2.9. Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> em modelo animal.....	69
5. CONCLUSÃO.....	76

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
---	-----------

ANEXO.....	87
-------------------	-----------

Anexo 1 – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	88
---	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia Gênica – Interferência de RNA (RNAi)

O projeto genoma tem fornecido informações abrangentes e acessíveis sobre os genes humano. Esta completa caracterização do genoma humano trouxe grande esperança em tornar a terapia gênica uma realidade. Através da terapia gênica é possível expressar seletivamente proteínas identificadas como benéficas para o adequado funcionamento do organismo ou inibir proteínas consideradas maléficas, desta forma, a terapia gênica se apresenta como uma perspectiva única para o tratamento de doenças (NABEL, 2004).

A terapia antisense que envolve a inibição da expressão de genes é amplamente empregada para identificação e caracterização da função de genes. Os resultados desta identificação podem ser usados na determinação de genes alvos envolvidos em diversas doenças. A compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos em patologias graves, como o câncer, pode ser muito útil para o desenvolvimento de novas terapias baseadas na supressão da expressão gênica (DE *et al.*, 2009).

O silenciamento gênico pode ser promovido por processo transcricional ou pós-transcricional (DE *et al.*, 2009), o qual é um evento de repressão gênica através da degradação de RNA mensageiro (RNAm). Este fenômeno foi primeiro descrito em 1990 por Richard Jorgensens e Joseph Mols que introduziram um transgene em petúnias com o objetivo de produzir as flores com coloração violeta mais intensa. Surpreendentemente, eles observaram o silenciamento tanto do transgene quanto do gene endógeno, obtendo flores totalmente brancas ou irregularmente coloridas. Mais tarde, efeitos similares foram encontrados em fungos *Neurospora crassa*. Guo e Kemphues investigaram a função do gene *par-1* em *Caenorhabditis elegans* e observaram que tanto a fita sense quanto a antisense tiveram o mesmo efeito quando injetadas separadamente (SIFUENTES-ROMERO *et al.*, 2011). Andrew Fire e Craig Mello obtiveram resultados similares aos de Guo e Kemphues com a injeção das fitas simples de RNA, porém ao injetar RNA de fita dupla (dsRNA) eles observaram que o efeito obtido foi mais pronunciado que cada fita individualmente, houve uma maior supressão da expressão do gene com sequência similar àquele dsRNA. Este processo ficou conhecido como Interferência de RNA (RNAi) (FIRE *et al.*, 1998; SIFUENTES-ROMERO *et al.*, 2011)

RNAi é um processo que ocorre naturalmente nos organismos eucariotos participando dos mecanismos de regulação da expressão gênica. Também tem

papel fundamental na eliminação de RNAm anormais e na defesa do organismo contra parasitas moleculares como transposons e vírus (SUN; TSAO, 2008).

Com a descoberta desta propriedade natural, o processo de RNAi tornou-se grande aliado na pesquisa da função dos genes e na identificação de potenciais genes causadores de doenças (LENZ, 2005). Além desta importante função na pesquisa de novos genes, o RNAi aparece como uma promissora abordagem para o tratamento de diversas doenças, principalmente as de causa genética. Muitas doenças são causadas pela superexpressão de um ou múltiplos genes e como todas as células tem a maquinaria de RNAi e qualquer gene é um alvo potencial, RNAi se apresenta como um potencial terapêutico para o tratamento de doenças que são intratáveis ou pouco responsivas às terapias atuais como o câncer, doenças neurodegenerativas, infecções e inflamações, doenças respiratórias, degeneração macular e doenças auto-imunes (DYKXHOORN; PALLISER; LIEBERMAN, 2006; SCHROEDER *et al.*, 2010)

Assim, a descoberta em 1998 de moléculas de dsRNA capazes de eliminar a expressão de um determinado gene com seqüência similar àquele dsRNA no nemátodo *Caenorhabditis elegans* através do processo de RNAi (FIRE *et al.*, 1998), bem como a publicação de que siRNA (*small interfering RNA*) suprimi especificamente a expressão de genes em diferentes células de mamíferos (ELBASHIR *et al.*, 2001), revolucionou as pesquisas das áreas das ciências biológicas e biomédicas (DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007).

O mecanismo de RNAi (**Figura 1**) pode ser dividido em duas fases: a fase de iniciação, onde as moléculas efetoras (siRNA e microRNA (mi-RNA)) são geradas e a fase de execução, na qual ocorre a incorporação das moléculas efetoras em complexos protéicos e promoção do silenciamento gênico. A geração de siRNA começa no citoplasma pela clivagem de dsRNA pela enzima Dicer em pequenos nucleotídeos de aproximadamente 21-23 bases. A geração do mi-RNA inicia-se no núcleo onde os miRNA primários (pri-RNA) codificados endogenamente são processados em precursor miRNA (pre-miRNA). Estes pre-miRNA são transportados para o citoplasma onde são clivados pela Dicer. Na fase de execução o siRNA e o miRNA são incorporados em um complexo protéico RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Uma helicase presente neste complexo abre a dupla-fita dos siRNAs e miRNA, a fita antisense é usada como guia para reconhecer o RNAm alvo, que é clivado pelo complexo (ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001; WHITEHEAD;

LANGER; ANDERSON, 2009; DAVID *et al.*, 2010; SIFUENTES-ROMERO *et al.*, 2011).

O siRNA tem uma complementaridade perfeita com o RNAm alvo, enquanto o miRNA tem normalmente uma sequência imperfeita, o que leva o silenciamento gênico sem a degradação do RNAm (DAVID *et al.*, 2010).

Figura 1: Mecanismo de interferência de RNA. Adaptado de SIFUENTES-ROMERO, *et al.* (2011).

Dentre as maiores vantagens das estratégias de silenciamento gênico pela via RNAi estão sua grande especificidade pelo alvo, que pode ser controlada pela especificidade de pareamento de pares de base de Watson-Crick e a escolha quase irrestrita de alvos (AAGAARD; ROSSI, 2007).

Existem três estratégias para ativar a via RNAi e promover o silenciamento dos genes de interesse: (1) introdução de DNA plasmidial no núcleo da célula alvo; (2) administração de moléculas precursoras das moléculas efetoras ou (3) administração de siRNA sintético no citoplasma da célula alvo. Esta última estratégia é a mais simples delas, uma vez que a síntese de siRNA é um processo relativamente simples, tem baixa probabilidade de efeitos colaterais e é seguro já que não se integra ao genoma humano (DAVID *et al.*, 2010).

Uma molécula de siRNA pode ser usada repetidas vezes para guiar a clivagem de muitas moléculas do RNAm-alvo (ELBASHIR *et al.*, 2001). Uma das maiores vantagens de usar siRNA é que, comparado aos oligonucleotídeos antisense, siRNA é 10-100 vezes mais potente para o silenciamento de gene (OZPOLAT; SOOD; LOPEZ-BERESTEIN, 2010).

Esta capacidade do siRNA em promover potencialmente, mas reversivelmente, o silenciamento de genes *in vivo*, os torna adequados como uma nova classe terapêutica para a supressão de genes promotores ou causadores de doença (DE FOUGEROLLES, 2008). Como por exemplo, a redução na expressão de proteínas patológicas através de siRNA é aplicável a todas as classes de moléculas alvo, incluindo aquelas que são difíceis de modular seletivamente com as abordagens farmacêuticas tradicionais. Desta forma, a terapia com siRNA tem o potencial de transformar a medicina moderna (BUMCROT *et al.*, 2006; JACKSON; LINSLEY, 2010).

Desde a primeira evidência da eficácia terapêutica baseada em RNAi *in vivo* em um modelo de doença animal em 2003, o ritmo do desenvolvimento desta terapia tem sido rápido (DE FOUGEROLLES *et al.*, 2007). Atualmente, 25 estudos clínicos estão sendo realizados, sendo nove para o tratamento de câncer (www.clinicaltrials.gov).

1.2. Sistemas de liberação e vias de administração para veiculação de siRNAs

O siRNA é uma molécula grande (duas voltas de um ácido nucléico de dupla hélice), de alto peso molecular (mais de 13 KDa), e tem cerca de 40 cargas aniônicas devido ao seu esqueleto fosfodiéster (BUMCROT *et al.*, 2006), portanto não consegue atravessar a membrana citoplasmática por difusão passiva (LU; LANGER; CHEN, 2009).

O principal desafio para aplicação terapêutica de siRNA é a criação de um sistema de liberação efetivo e não tóxico (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009). Felizmente, estes desafios estão cada vez mais bem compreendidos, assim como as técnicas para mitigá-los (JACKSON; LINSLEY, 2010).

Várias abordagens de liberação de siRNA demonstraram sucesso, desde a simples administração local de siRNA em salina até métodos mais complexos como lipossomas, nanopartículas baseadas em polímeros e uso de anticorpos e peptídeos para guiar e facilitar a entrada em células alvo. Para a aplicação terapêutica do

siRNA, várias tecnologias de liberação serão necessárias, a escolha de qual sistema deve ser usado depende da natureza da indicação clínica, da via de administração e dos tipos de células-alvo (DE FOUGEROLLES, 2008).

Desta forma, a aplicação terapêutica do siRNA requer o desenvolvimento de carreadores que irão proteger o siRNA da degradação (LARSON *et al.*, 2007); evitar a liberação em células não alvo e facilitar a internalização celular e o escape endossomal de modo que o siRNA fique acessível à maquinaria celular (SCHROEDER *et al.*, 2010).

Basicamente, os sistemas de liberação podem ser divididos em virais e não virais (REISCHL; ZIMMER, 2009). Os sistemas virais têm mostrado alta eficiência de transfecção, mas há muitos riscos relacionados às reações imunes e tóxicas além de uma possível recombinação viral, portanto as questões de segurança são um obstáculo para seu uso (REISCHL; ZIMMER, 2009; GHOSN *et al.*, 2010).

Os sistemas não virais, que normalmente consistem de siRNA incorporado a lipídeos e polímeros, tem se mostrado bastante promissores devido a sua segurança, porém, a expressão genética mediada por estes carreadores ainda é baixa quando comparada com os vetores virais (REISCHL; ZIMMER, 2009).

Os lipídeos e polímeros catiônicos formam complexos com siRNA através de interações eletrostáticas de sua carga positiva com a carga negativa do siRNA, esta complexação evita os problemas de repulsão pela membrana celular que tem uma carga residual negativa, diminui o tamanho dos ácidos nucleicos devido à condensação da molécula facilitando, assim, a sua internalização pelas células e evitando a degradação por nucleases (GUNTHER *et al.*, 2011; BEYERLE *et al.*, 2011).

As interações eletrostáticas devem ser suficientemente estáveis para sustentar a complexação do ácido nucleico durante o transporte até a célula alvo, mas deve permitir a dissociação para que o siRNA fique disponível para a maquinaria celular e exerça sua atividade terapêutica (SCHROEDER *et al.*, 2010).

A principal via de entrada do siRNA na célula é por endocitose, desta forma para sua ação é necessário o escape endossomal (SCHROEDER *et al.*, 2010). A alta eficiência de transfecção de ácidos nucleicos promovida por polímeros catiônicos como a polietilenoimina se deve em grande parte à maneira como este facilita o escape endossomal por um processo denominado “efeito esponja de prótons” (GUNTHER *et al.*, 2011). Após a internalização, o endossoma acidifica e as

aminas dos polímeros e lipídeos catiônicos que tem pKa normalmente entre 7 e 5 ficam protonadas. Isto é seguido por um influxo de prótons adicionais bem como íons cloreto. A captação de íons cria um desequilíbrio osmótico, resultando em um influxo de água para tentar alcançar o equilíbrio. O endossoma então se incha até o seu rompimento. A ruptura do endossoma libera o conteúdo para o citoplasma (SCHROEDER *et al.*, 2010; GUNTHER *et al.*, 2011).

Os polímeros catiônicos têm ganhado atenção devido sua biocompatibilidade e versatilidade. Um dos polímeros catiônicos mais estudados é a polietilenoimina (PEI) (**Figura 2**), um polímero sintético solúvel em água que pode ser linear ou ramificado, com uma densidade de carga catiônica alta em pH fisiológico, devido aos seus grupos amina livre (GUNTHER *et al.*, 2011; KREBS; ALSBERG, 2011). A eficiência de transfecção e citotoxicidade dos sistemas de liberação obtidos com PEI são influenciadas por muitas características tais como a estrutura molecular, peso molecular, potencial zeta, potencial iônico da solução, tamanho de partícula, seqüência e flexibilidade conformacional e densidade de carga catiônica (BEYERLE *et al.*, 2011).

Figura 2: Estrutura molecular do polímero catiônico PEI. Adaptado de DE *et al.* (2009).

Complexos de PEI-siRNA têm demonstrado benefícios terapêuticos *in vivo* em vários modelos de doenças. PEI complexado com siRNA demonstrou efeito antiviral em camundongos infectados com influenza, similarmente siRNA resultou em proteção parcial contra infecção Ebola em cobaias. O complexo também demonstrou ter atividade anti-tumoral (DE FOUGEROLLES *et al.*, 2007).

Lipídeos catiônicos também têm sido amplamente usados como carreadores, devido formarem lipoplexos com DNA e siRNA resultando em alta eficiência de transfecção *in vitro* (OZPOLAT; SOOD; LOPEZ-BERESTEIN, 2010). Um exemplo de lipídeo catiônico utilizado é a oleilamina (OAM) (**Figura 3**), que é monocatiônica contendo uma cadeia monoleil que em pH fisiológico encontra-se totalmente ionizada conferindo um residual positivo ao sistema (MARTINI *et al.*, 2008).

Figura 3: Estrutura molecular do lipídeo catiônico OAM (MARTINI *et al.*, 2008).

Além do sistema carreador, o desenvolvimento racional de sistemas de liberação de siRNA também deve levar em consideração a via de administração e, considerando as várias barreiras biológicas das membranas de absorção, o maior obstáculo para o uso de siRNA como agente terapêutico é conseguir a sua liberação dentro da célula (DYKXHOORN; PALLISER; LIEBERMAN, 2006).

A via de administração do siRNA depende da localização do tecido alvo (BUYENS *et al.*, 2008), podendo ser sistêmica ou local. A baixa capacidade de penetração do siRNA através da membrana plasmática celular combinada com a sua limitada estabilidade no sangue, limita a eficácia da sua administração sistêmica (TARATULA *et al.*, 2009). A administração local de siRNA tem algumas vantagens em relação à sistêmica, como a necessidade de menores doses para se ter eficácia; também permite uma aplicação mais direcionada que evita os efeitos secundários indesejados da administração sistêmica (DE FOUGEROLLES *et al.*, 2007).

Para indicações clínicas, onde a administração de siRNA localizada é indicada (como por exemplo a pele, olhos, pulmão, vagina e tumores superficiais), a liberação e o silenciamento gênico podem ser conseguidos com a obtenção de sistemas formados por siRNA e compostos catiônicos, como os lipídeos, que promovem a transfecção celular do ácido nucléico (DYKXHOORN; PALLISER; LIEBERMAN, 2006).

Para aplicações locais, uma estratégia interessante é o uso de sistemas de liberação capazes de liberar concentrações do ativo por um período de tempo prolongado, assim maximizando o benefício terapêutico e evitando possíveis efeitos colaterais. Sistemas de liberação local têm sido usados para aumentar a concentração do ativo e facilitar a entrada nas células alvo (HAN *et al.*, 2011).

A duração do silenciamento do gene promovido pelo siRNA depende tanto do número de moléculas de siRNA transfectadas quanto da taxa de duplicação da célula. O siRNA parece ter um efeito de silenciamento gênico mais prolongado em células com baixa taxa de divisão celular do que em células que se dividem rapidamente. A atividade do siRNA dura de três a sete dias em células proliferativas

enquanto que em células tais como neurônios tem atividade por três semanas (KARAGIANNIS; EL OSTA, 2005; MASIERO *et al.*, 2007).

Desta forma, o desenvolvimento de sistemas de liberação sustentada e localizada é ideal para a administração de siRNA em células proliferativas.

1.3. Sistemas de liberação sustentada - Cristais Líquidos

O objetivo de uma formulação de liberação sustentada é administrar o fármaco em concentrações dentro do intervalo terapêutico durante um período de tempo prolongado. Uma forma de obter liberação sustentada é incorporar o fármaco numa matriz (DRUMMOND; FONG, 2000).

Sistemas injetáveis de liberação controlada ou sustentada de fármacos têm sido desenvolvidos para evitar a degradação gastrointestinal ou o efeito de primeira passagem, bem como para liberá-los por períodos superiores aos obtidos pela administração oral. Estes sistemas incluem óleo injetável, emulsões, suspensões, lipossomas, e sistemas de liberação poliméricos na forma de implantes ou micropartículas. Injeção subcutânea e intramuscular são as vias de administração mais comum para as formas farmacêuticas injetáveis de liberação sustentada (CHANG; BODMEIER, 1998).

Neste contexto, os sistemas de geleificação *in situ* têm ganhado importância na liberação de fármacos devido à fácil administração, liberação local e sustentada, redução de dose, facilidade de fabricação, habilidade de liberação de fármacos insolúveis em água e aumento da adesão e conforto do paciente (HATEFI; AMSDEN, 2002; SHARMA *et al.*, 2007). As formulações injetáveis que formam gel *in situ* evitam a administração frequente de doses bem como os procedimentos cirúrgicos dolorosos para inserção de implantes (MATSCHKE *et al.*, 2002).

O uso de formulação capaz de geleificação *in situ* foi mais efetivo e seguro para a absorção nasal de DNA plasmidial (PARK *et al.*, 2002), como também promoveu uma indução mais eficaz das respostas imunes quando usada para vacina vaginal (PARK *et al.*, 2003). Mostraram-se, ainda, eficientes para a liberação de substância hidrofílica como a glicose (FONG; HANLEY; BOYD, 2009) e promoveram a liberação sustentada de peptídeos como a insulina (SADHALE; SHAH, 1999; PACKHAEUSER; KISSEL, 2007) e outras macromoléculas (FERREIRA, 2005).

Estes sistemas também promoveram a liberação sustentada de naltrexona, um fármaco utilizado no tratamento de dependentes de droga (PHELPS; BENTLEY; LOPES, 2011). Sistema de geleificação *in situ* obtido a partir de quitosana também foi utilizado para a liberação de siRNA para o tratamento do câncer de mama e melanoma, demonstrando que a liberação localizada de siRNA a partir do gel atingiu eficácia terapêutica sem promover efeitos adversos sistêmicos (HAN *et al.*, 2011).

Baseado no mecanismo de formação de gel *in situ* estas formulações podem ser classificadas em:

(I) Pastas termoplásticas, que são sistemas poliméricos injetados derretidos que formam gel quando resfriam no corpo;

(II) Sistemas crosslinked *in situ*, que podem ser formados por vários mecanismos tais como foto-iniciação, interação iônica ou polimerização iniciada por radicais;

(III) Sistemas obtidos por precipitação *in situ* de polímeros, os quais são formados por polímeros que ao serem injetados subcutânea ou intramuscularmente precipitam formando um implante sólido polimérico. Esta precipitação pode ser induzida por: a) remoção de solvente: polímero biodegradável insolúvel em água é dissolvido em solvente miscível em água, após a injeção o solvente se difunde no ambiente aquoso enquanto a água entra na matriz polimérica, como o polímero é insolúvel em água, ocorre precipitação do mesmo; b) mudança na temperatura: uso de um polímero termosensível; ou c) alteração de pH: uso de polímero pH dependente, e;

(IV) Solidificação *in situ* de organogels, que são compostos de lipídeos polares ou outras anfífilas, os quais incham na presença de água e formam vários tipos de cristais líquidos liotrópicos (HATEFI; AMSDEN, 2002; PACKHAEUSER; KISSEL, 2007).

Cristais líquidos são definidos como o estado da matéria cujas propriedades mecânicas e simétricas são intermediárias entre os sólidos cristalinos e os líquidos isotrópicos. A diferença entre líquidos e cristais sólidos é o estado de ordem. Nos líquidos as moléculas se difundem livremente, já nos sólidos cristalinos as moléculas estão altamente organizadas (SINGH, 2000).

O uso de fases líquido cristalinas liotrópicos formadas a partir de moléculas anfífilas em ambiente aquoso para a liberação sustentada de fármacos tem sido uma proposta explorada há vários anos. De maneira geral, o perfil de liberação do

fármaco a partir da matriz é influenciada por: (i) fatores relacionados ao fármaco tais como constante de difusão, solubilidade e coeficiente de partição e (ii) fatores relacionados a matriz tais como geometria, porosidade e tortuosidade dos poros. Quando as dimensões moleculares do fármaco são comparáveis as do tamanho do poro, a constante de difusão é o fator mais importante na determinação da taxa de liberação. Interações fortes específicas entre o fármaco e as moléculas que compõem o sistema podem modular esta liberação (DRUMMOND; FONG, 2000).

Os monoglicerídeos insaturados como a monoleína (gliceril monoleato, MO) ou monolinoleína formam vários tipos de fases de cristal líquido em consequência da hidratação em meio aquoso (CHANG; BODMEIER, 1998).

A monoleína (**Figura 4**) é composta de uma cadeia de hidrocarboneto a qual é ligada a um glicerol por uma ligação éster. Os dois grupos hidroxilas restantes na porção glicerol (comumente chamado de domínio polar ou cabeça polar) conferem à molécula características polares, formando pontes de hidrogênio com a água em soluções aquosas. A cadeia de hidrocarbonetos (C18) (normalmente referida como cauda), com uma dupla ligação cis na posição 9,10, é fortemente hidrofóbica. Consequentemente, a monoleína é uma molécula anfifílica com equilíbrio hidrófilo-lipófilo igual a 3,8 (KULKARNI *et al.*, 2011).

Figura 4: Estrutura química da MO (KULKARNI *et al.*, 2011).

A formação das fases líquido cristalinas a partir da MO acontece pela hidratação dos domínios polares da MO por um solvente hidrofílico como a água, através de ligações de hidrogênio, enquanto as caudas se agregam com base em interações da Van der Waals. A natureza da fase formada também depende de parâmetros externos como a temperatura, pressão (HATEFI; AMSDEN, 2002; LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011) e aditivos (CABOI *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2006a; LOPES *et al.*, 2006b).

Os cristais líquidos podem ter diversos tipos de estruturas moleculares, sendo classificados em termotrópicos ou liotrópicos. Os termotrópicos são os cristais

líquidos obtidos por aumento da temperatura e os liotrópicos são aqueles no qual a sua obtenção é influenciada pela presença e proporção dos solventes (SINGH, 2000), sendo classificados em: fase lamelar, hexagonal, cúbica ou líquido isotrópico (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

A natureza da fase líquida cristalina formada depende das propriedades estruturais dos lipídeos, temperatura, características do fármaco incorporado, e quantidade de água no sistema (CHANG; BODMEIER, 1998; FONG; HANLEY; BOYD, 2009), de forma que alterações nestes parâmetros podem gerar uma mudança de fase. O fato de empacotamento é um parâmetro útil para prever a mesofase preferencialmente formada por um composto anfifílico, uma vez que relaciona o formato da molécula com propriedades que influenciam a curvatura da interface polar-apolar e, conseqüentemente, o tipo de agregado formado (MITCHELL; NINHAM, 1981):

$$k = \frac{Vh}{Ao.Lc} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde K representa o fator de empacotamento, Vh relaciona-se ao volume da cauda hidrocarbonada, Ao a área da cabeça polar e Lc ao comprimento do anfifílico. A **Figura 5** relaciona o parâmetro de empacotamento com os tipos de fases formadas.

Figura 5: Estruturas líquido cristalinas formadas dependendo do parâmetro de empacotamento, teor de água e temperatura. Adaptado de BORNÉ *et al.*, (2001).

A fase lamelar consiste de um arranjo linear que alterna bicamada lipídica e canais de água (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001), formando uma estrutura unidimensional.

A fase hexagonal é caracterizada por longas estruturas cilíndricas bidimensionais (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001), podendo existir em duas formas: (i) a fase reversa, a qual as cabeças polares da anfifila ficam na região interna dos cilindros e a porção apolar fica localizada ao redor dos cilindros; e (ii) a fase normal, onde as cabeças polares da anfifila localizam-se na região externa dos cilindros. O gel de fase hexagonal apresenta-se anisotrópico ao campo de luz polarizada, com textura estriada não geométrica ou em formato de placas (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001; LIBSTER *et al.*, 2009). A fase hexagonal de MO/água existe apenas em temperaturas elevadas. No entanto, demonstrou-se que a adição de componentes na preparação pode induzir a formação de fase hexagonal à temperatura ambiente (LIBSTER *et al.*, 2007).

A fase cúbica é uma organização oticamente isotrópica (KUTSUMIZU, 2002), com bicamadas lipídicas curvas em três dimensões separadas por canais de água. É altamente viscosa e fisicamente estável. Em água a fase cúbica tem sido descrita por promover uma liberação sustentada de fármacos hidrofílicos (CHANG; BODMEIER, 1997b). Esta fase mostra-se altamente flexível para a incorporação de fármacos de diferentes polaridades e concentrações (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

A fase cúbica está presente entre a fase lamelar e a fase hexagonal reversa e a transformação da fase ocorre pelo aumento de água ou de temperatura. Uma vez que a fase lamelar é menos viscosa e, portanto, passível de injeção, ela pode ser usada para a liberação do gel, a qual em contato com excesso de água dos fluidos corporais forma a fase cúbica viscosa promovendo a liberação sustentada (CHANG; BODMEIER, 1998; SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001). Com estas propriedades, os sistemas de fases líquido cristalinas tornam-se interessantes como sistemas de geleificação *in situ* para a liberação sustentada de fármacos.

Como a aplicação terapêutica do siRNA é dependente do desenvolvimento de sistemas de liberação (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009) e o efeito do siRNA em células proliferativas, como por exemplo o câncer, é curto (MASIERO *et al.*, 2007), o presente trabalho propôs o desenvolvimento farmacotécnico de formulações líquido cristalinas com formação de gel *in situ* após administração por via subcutânea como sistemas carreadores para liberação sustentada de siRNA.

Para obtermos os sistemas propostos, o desenvolvimento foi guiado pelas seguintes premissas:

- (i) obtenção de sistemas capazes de se geleificarem *in situ* e promoverem liberação sustentada (formulações líquido isotrópicas que formam cristais líquidos viscosos com a absorção de água no meio biológico),
- (ii) presença de promotor de absorção para facilitar a entrada do siRNA nas células/tecidos (uso de monoleína),
- (iii) incorporação de adjuvante que complexe o siRNA e auxilie na internalização celular e escape endossomal (incorporação de PEI ou OAM);
- (iv) formulação biocompatível e biodegradável, passível de ser injetada e esterilizada.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é o desenvolvimento farmacotécnico de formulações líquido cristalinas com formação de gel *in situ* após administração por via subcutânea como sistemas carreadores para liberação sustentada de siRNA.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Desenvolvimento de formulações líquidas precursoras de sistemas líquido cristalinos baseados em MO e incorporados de PEI ou OAM com capacidade de formação de gel *in situ*

2.1.1.1. Obtenção e caracterização por microscopia de luz polarizada das formulações;

2.1.1.2. Avaliação *in vitro* da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água;

2.1.1.3. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionadas;

2.1.1.4. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas;

2.1.2. Otimização dos sistemas obtidos para a administração subcutânea de siRNA

2.1.2.1. Adequação das formulações com capacidade de formação de gel *in situ*;

2.1.2.2. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionadas;

2.1.2.3. Avaliação *in vitro* da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água;

2.1.2.4. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado nas formulações precursoras selecionadas;

2.1.2.5. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas;

2.1.2.6. Caracterização dos géis obtidos após o intumescimento por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS);

2.1.2.7. Avaliação do perfil de liberação do siRNA *in vitro*;

2.1.2.8. Avaliação da formação de gel *in situ* em modelo animal;

2.1.2.9. Avaliação da toxicidade *in vivo* em modelo animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material:

3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas:

- Monoleína (Myverol 18-92 K) - Kerry Bio Science, (Zwijndrecht, Holanda)
- Polietilenoimina - Sigma Aldrich Co., (St. Louis, MO, EUA)
- Oleilamina - Sigma Aldrich GmbH, (Germany)
- Propilenoglicol - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, (Diadema, SP, Brasil)
- siRNA controle - Silencer Negative Control #1 siRNA (#AM4635) Ambion (Austin, TX, EUA)
- Dietilpirocarbonato (DEPC) - Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA)
- Tris (hidroximetil) aminometano – Merck KGaA (Germany)
- UltraPure™ Agarose – Invitrogen, (Carlsbad, CA, EUA)
- Tissue-Tec® OCT™ Compound – Sakura Finetek USA, Inc., (Torrance, CA, EUA)
- Isopentano - Sigma Aldrich Co., (St. Louis, MO, EUA)
- Heparina (Heparina sódica 5.000 U.I./mL) – Blausiegel, (Cotia, SP, Brasil)
- Kapton – DuPont, (Delaware, E.U.A.)
- Brometo de etídio - Sigma Aldrich Co., (St. Louis, MO, EUA)
- Água obtida por osmose reversa
- Água ultra pura obtida pelo sistema Milli-Q

3.1.2. Equipamentos e acessórios:

- Microscópio ótico (modelo AxioPlan 2 Image, Carl Zeiss) equipado com filtro polarizador e acoplado à câmera digital Axiocan HRc (Carl Zeiss AG, Alemanha)
- Balança Analítica – Ohaus
- Agitador mecânico tipo mixer – Ika
- Chapa de aquecimento - Fisatom
- Medidor de pH (Digimed)
- Cuba eletroforética – BioRad
- Membrana de diálise de 50000 Da *cut off* - Spectrum Laboratories, Inc
- Banho termoregulado - FANEM® modelo 1100
- Concentrado – Eppendorf Concentrator 5301
- Membrana de 0,20 µM – Corning Incorporated (Germany)

- Placa de 12 poços – Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NY, USA)
- Insert com membrana com poro de 1 μm – Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NY, USA)
- Fluxo Laminar – Veco modelo VLFS 12M
- Criostato - Leica CM1850
- Microscópio motorizado Olympus BX61 acoplado a Câmera Olympus DP72
- Câmera - Sony modelo DSC-WX9
- Seringa descartável de 1mL com agulha 26G $\frac{1}{2}''$ - Embramac[®] (Campinas, SP, Brasil)

3.2. Métodos

3.2.1. Desenvolvimento de formulações líquidas precursoras de sistemas líquido cristalinos baseados em MO e incorporados de PEI ou OAM com capacidade de formação de gel *in situ*

3.2.1.1. Obtenção e caracterização por microscopia de luz polarizada das formulações

3.2.1.1.1. Diagramas ternários

A obtenção das formulações seguiu os métodos propostos por Ferreira (2005). A monoleína (MO) foi aquecida em banho de água termostatizado até a temperatura de fusão (42° C) e em seguida foi adicionado propilenoglicol (PG) nas proporções de 1:9 a 9:1. As misturas obtidas foram homogeneizadas. Após a homogeneização foi adicionado a fase aquosa (tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,5 – tampão Tris) previamente aquecida a mesma temperatura, em concentrações variando entre 5 e 90 %. O PEI foi incorporado a MO nas proporções 12:1, 6:1 e 3:1 (MO/PEI) p/p. A OAM foi incorporada a MO nas proporções 12:1 e 24:1 (MO/OAM) p/p. Todos os sistemas foram deixados em repouso por 24 horas após o preparo para equilíbrio dos mesmos e acondicionados ao abrigo da luz.

3.2.1.1.2. Caracterização dos sistemas obtidos por microscopia de luz polarizada

Os sistemas obtidos foram caracterizados após 24 horas e 7 dias 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.

As análises macro e microscópicas forneceram as informações para a construção dos diagramas ternários.

3.2.1.2. Avaliação *in vitro* da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água

A partir dos diagramas ternários foram selecionadas as formulações líquidas homogêneas e estáveis por pelo menos 24 horas para o teste de geleificação *in vitro*. O teste de formação de gel *in vitro* foi realizado adicionando-se 100 µL da formulação precursora à 900 µL de H₂O DEPC e mantidos a 37° C em banho termoregulado. Os géis formados foram analisados por microscopia de luz polarizada após 24 horas e 7 dias.

3.2.1.3. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionadas

3.2.1.3.1. Preparo do gel de agarose 2 %

Para o estudo da eficiência de complexação do siRNA pelas formulações previamente selecionadas foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2 % (TRAN *et al.*, 2008). O gel foi preparado com 2 g de agarose, 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 minutos 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.

3.2.1.3.2. Preparo das amostras

A incorporação do siRNA nas formulações previamente selecionadas foi realizada pela adição deste sobre as diferentes formulações (concentração final de 10 µM), seguida de agitação e repouso a temperatura ambiente por 30 min para que ocorresse a complexação do siRNA pelas mesmas.

As amostras a serem aplicadas no gel: formulações precursoras com siRNA e os controles (siRNA em água DEPC e as formulações sem siRNA) foram preparadas

pela mistura de 10 µL de *loading buffer* (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 formulação contendo siRNA ou controle. Dessa mistura, aplicou-se 40 µL em cada poço do gel.

As corridas eletroforéticas foram processadas em cuba horizontal contendo tampão TAE, sob uma voltagem de 100 V, durante 20 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídeo e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta. Para obtenção das imagens utilizou-se o software Quantity One.

3.2.1.4. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas

A determinação da capacidade de intumescimento das formulações precursoras contendo PEI ou OAM foi realizada gravimetricamente. Para tal, 100 µL das formulações precursoras escolhidas foram colocadas em membrana de diálise (50000 Da *cut off*) e em contato com excesso de água (3 mL). As amostras foram acondicionadas em banho termoregulado a 37° C. Em intervalos de tempos fixos (15 e 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas), cada amostra foi retirada e, delicadamente, secou-se a superfície das membranas de diálise com papel para remover o excesso de água. As membranas foram então pesadas. Como controle foi utilizada formulação sem a adição do polímero ou lipídeo catiônico. A absorção de água foi plotada de acordo com as equações cinéticas de primeira (**Equação 2**) e segunda ordem (**Equação 3**), conforme descrito na literatura (CHANG; BODMEIER, 1997b; LEE *et al.*, 2003; LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005; RIZWAN *et al.*, 2009):

$$\ln \frac{W_{\infty}}{W_{\infty} - W} = kt \quad \text{(Equação 2)}$$

$$\frac{t}{W} = \frac{1}{kW_{\infty}^2} + \frac{t}{W_{\infty}} \quad \text{(Equação 3)}$$

onde W é a absorção de água no tempo t, W_∞ é o máximo de água absorvido, k é a constante. Para cinética de absorção de segunda ordem, o máximo ou o equilíbrio de absorção de água (W_∞) pode ser descrito como a recíproca da inclinação da reta

e a taxa inicial de absorção é a recíproca do intercepto com eixo y do gráfico t/W versus t (CHANG; BODMEIER, 1997b; LEE *et al.*, 2003; LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005; RIZWAN *et al.*, 2009).

3.2.2. Otimização dos sistemas obtidos para a administração subcutânea de siRNA

3.2.2.1. Adequação das formulações com capacidade de formação de gel *in situ*

As formulações selecionadas foram preparadas com proporções de PEI e OAM reduzidas em 50, 75 e 90 % e obtidas conforme descrito no item 3.2.1.1.1.

3.2.2.2. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionadas

As formulações foram analisadas quanto a sua capacidade de complexar com o siRNA e quanto a sua carga superficial relativa conforme descrito no item 3.2.1.3.

3.2.2.3. Avaliação *in vitro* da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água

As formulações precursoras que complexaram com o siRNA foram colocadas em contato com excesso de água para verificar a formação de gel *in vitro*, conforme descrito no item 3.2.1.2.

3.2.2.4. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado nas formulações precursoras selecionadas

As formulações selecionadas foram avaliadas quanto à capacidade de complexar e não degradar o siRNA. Para tal, o siRNA foi adicionado a formulação na concentração final de 10 μ M e após agitação deixado em repouso por 30 minutos. Então, foi adicionado 10 μ L de solução de heparina sódica (5.000 U.I./mL) e agitado. A formulação com heparina foi deixada em banho termostatzado a 37 °C por uma hora, para que ocorresse a descomplexação do siRNA, seguindo o método proposto por Shen *et al.* (2011). Foram testados diferentes volumes de solução de heparina a ser adicionado para promover a descomplexação, sendo que 10 μ L de solução de heparina sódica (5.000 U.I./mL) foi adequado para este propósito.

Estas formulações foram então, aplicadas em gel de agarose 2 % e foi

realizada a corrida eletroforética, conforme descrito no item 3.2.1.3.

Foram utilizados quatro controles: siRNA 10 μ M em água DEPC, siRNA 10 μ M em água DEPC + 10 μ L de heparina, solução de Heparina sódica 5.000 U.I./mL e a formulação complexada com siRNA sem heparina.

3.2.2.5. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas

As formulações selecionadas para a liberação subcutânea de siRNA foram analisadas quanto a sua capacidade de absorção de água e determinou-se a cinética de intumescimento, como descrito no item 3.2.1.4.

3.2.2.6. Caracterização dos géis obtidos após o intumescimento por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A formação das várias mesofases com o aumento da hidratação pode ser determinada por métodos como o espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) ou difração de raios X a baixo ângulo (CHANG & BODMEIER, 1997b), denominação utilizada devido às dimensões destas mesofases. A difração de raios X é uma técnica na qual raios X são usados para determinar distâncias repetitivas dentro de matérias. Materiais cristalinos, tanto sólidos como cristais líquidos, podem ser caracterizados através da difração de raios X. Neste trabalho, as medidas do ângulo de espalhamento 2θ foram realizadas utilizando $\lambda = 0,1608$ nm na linha de luz D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, Brasil, com a colaboração da Profa. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini. As medidas de intensidade foram analisadas em função do vetor de onda $q = (4\pi\sin\theta)/\lambda$. As amostras foram acondicionadas em suporte, entre folhas de Kapton (**Figura 6**). As intensidades foram registradas em um detector bidimensional, por um período de 300 segundos para as amostras sem PEI ou OAM e para as amostras com PEI e por um período de 150 segundos para as amostras com OAM. 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.

Figura 6: Suporte dos géis para análise por difração de raios X. (A) Suporte com Kapton e gel (indicado pela seta). (B) Kapton.

Todos os sistemas foram avaliados com e sem siRNA para identificar possível alteração na sua estrutura promovida pelo siRNA. Também avaliamos os sistemas sem e com a incorporação do polímero e lipídeo catiônico.

As seguintes formulações precursoras (100 μ L) foram adicionadas a 900 μ L de água DEPC, obtendo-se o gel que foi analisado por SAXS 24 horas após a sua formação:

- MO/PG/tampão Tris 15,69:68:16,31 (p/p/p);
- MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:1,31:68:15 (p/p/p/p);
- MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:0,131:68:16,179 (p/p/p/p);
- MO/PG/tampão Tris 7,85:76,5:15,65 (p/p/p);
- MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p);
- MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,065:76,5:15,585 (p/p/p/p);
- MO/PG/tampão Tris 16,32:68:15,68 (p/p/p);
- MO/OAM/PG/tampão Tris 16,32:0,68:68:15 (p/p/p/p);
- MO/PG/tampão Tris 8,16:76,5:15,34 (p/p/p);
- MO/OAM/PG/tampão Tris 8,16:0,34:76,5:15 (p/p/p/p).

O siRNA foi adicionado à formulação precursora na concentração final de 10 μ M e após leve agitação foi deixado em repouso por 30 minutos para que ocorresse a complexação. Após este intervalo a formulação foi então, adicionada a água DEPC e obteve-se o gel.

3.2.2.7. Avaliação do perfil de liberação do siRNA *in vitro*

O perfil de liberação do siRNA foi avaliado em placa de 12 poços com insert, conforme **Figura 7**. Às formulações selecionadas foram adicionados siRNA na concentração final de 10 μ M e após agitação deixado em repouso por 30 minutos para que ocorresse a complexação. Como controle foi utilizado o siRNA em água DEPC. 100 μ L das formulações e do controle foram adicionados sobre a membrana do insert. O meio receptor utilizado foi água DEPC (1800 μ L) e em intervalos de

tempo pré-estabelecidos: 48 horas, 7, 14, 21 e 30 dias o meio receptor foi coletado e novamente repostado com água DEPC. A placa de 12 poços foi mantida em banho termostaticado a 37° C.

Figura 7: Placa de 12 poços com insert para avaliação do perfil de liberação do siRNA *in vitro*.

As amostras coletadas foram divididas em dois eppendorfs, secas no concentrador de amostra e ressuspendidas em 40 μ L de água DEPC. Em uma amostra da duplicata foi adicionado 10 μ L de heparina. Todas as amostras foram colocadas em banho termostaticado a 37° C por 1 hora para que ocorresse a descomplexação do siRNA.

O siRNA liberado foi determinado qualitativamente em gel de agarose 2 % por eletroforese. O gel de agarose e a corrida eletroforética foram feitos conforme descrito no item 3.2.1.3. No gel foi aplicado uma curva-padrão na concentração de 0,5 a 8 μ M de siRNA.

3.2.2.8. Avaliação da formação de gel *in situ* em modelo animal

A formação de gel *in situ* das formulações escolhidas foi analisada através da administração destas por via subcutânea em camundongos BALB/c fêmeas, pesando entre 18-20 g. Os camundongos foram mortos após intervalos de tempo pré-determinados (24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 30 dias) e o gel foi avaliado em função do seu tempo de formação, bem como o tempo de permanência no tecido. A

presença do gel no sítio de injeção foi documentada com o auxílio de uma câmera Sony modelo DSC-WX9.

3.2.2.9. Avaliação da toxicidade *in vivo* em modelo animal

Os estudos de toxicidade *in vivo* foram realizados conforme proposto por Ferreira (2005). Cinquenta microlitros da formulação (sem siRNA) foi injetado subcutaneamente em camundongos BALB/c fêmeas, pesando entre 18-20 g. Para aplicação nos camundongos as formulações foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,20 µm realizada em fluxo laminar. Antes da aplicação foi feita uma assepsia do dorso do animal com álcool 70 %. Como controle foi utilizado animal recebendo solução salina e solução salina com siRNA (10 µM). Após intervalos de tempo pré-determinados (24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 30 dias), os animais foram mortos e os tecidos removidos para processamento e realização dos cortes histológicos.

A pele, o gel e o tecido adjacente em contato com a formulação foram removidos por ocasião do sacrifício dos animais, colocados sob um pedaço de fígado do animal, que serviu como suporte, e congelados imediatamente após a sua remoção em isopentano resfriado no nitrogênio líquido. Os tecidos foram mantidos a -80 °C até o momento do corte. Foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura em criostato. Os cortes foram dispostos em lâminas e corados com hematoxilina-eosina (H&E) para análise de alterações histológicas. As lâminas foram observadas ao microscópio motorizado Olympus BX61 acoplado a Câmera Olympus DP 72. As análises histológicas foram realizadas no Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP com a colaboração da Profa. Dra. Mamie Mizusaki Iyomasa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento de formulações líquidas precursoras de sistemas líquido cristalinos baseados em MO e incorporados de PEI ou OAM com capacidade de formação de gel *in situ*

4.1.1 Obtenção e caracterização por microscopia de luz polarizada das formulações

A capacidade de sistemas líquido cristalinos mais fluidos, como os líquidos isotrópicos e aqueles de fase lamelar, em absorver água dos fluidos biológicos e se transformar em sistemas mais rígidos como os de fase cúbica e hexagonal reversa é descrito na literatura (CHANG; BODMEIER, 1997a; CHANG; BODMEIER, 1997b; CHANG; BODMEIER, 1998; SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001; RIZWAN *et al.*, 2009). Estes sistemas são promissores para a administração parenteral de fármacos com liberação sustentada (SADHALE; SHAH, 1999; FONG; HANLEY; BOYD, 2009), uma vez que permitem que sejam injetados e ao entrar em contato com o excesso de água dos fluidos biológicos são capazes de absorver água e se transformarem em sistemas mais viscosos que promovem uma liberação controlada. Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram a capacidade de sistemas contendo MO em captar água, transformando-se em géis líquido cristalinos, sendo que a cinética de intumescimento seguiu o modelo de segunda ordem (LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005) e estudos *in vivo* (FERREIRA, 2005) mostraram a formação de géis *in situ* a partir de formulações precursoras líquidas.

A adição de componentes pode alterar a fase líquido cristalina obtida como observado por diversos estudos (GERAGHTY *et al.*, 1996; CHANG; BODMEIER, 1997a; CABOI *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2006a; LOPES *et al.*, 2006b; RIZWAN *et al.*, 2009). Para conhecer melhor a influência da adição do polímero catiônico PEI e do lipídeo catiônico OAM foram construídos diagramas de fases ternário com MO, PG, tampão Tris e PEI ou OAM, uma vez que estes diagramas são úteis para prever o comportamento de fases dos lipídeos, funcionando como um mapa que permite navegar entre as diferentes fases.

Para obtenção do diagrama ternário foram utilizadas misturas de MO/PG nas proporções de 1:9 a 9:1 e tampão Tris em concentrações variando de 5 a 90 %. O diagrama obtido a partir de MO/PG/tampão Tris está mostrado na **Figura 8**.

Os diagramas obtidos com a incorporação de PEI nas proporções de 12:1, 6:1 e 3:1 (MO/PEI) podem ser observados na **Figura 9 A, B e C** respectivamente. Na

Figura 10 A e B estão os diagramas obtidos com a incorporação de OAM nas proporções de 24:1 e 12:1 (MO/OAM), respectivamente.

24 horas

7 dias

● Fase Cúbica + Água	● Fase Lamelar + Fase Hexagonal
● Fase Cúbica	○ Líquido Isotrópico
● Fase Cúbica com pontos birrefringentes	● Líquido Isotrópico com pontos birrefringentes
● Fase cúbica com pontos birrefringentes + água	● Líquido com transição de fase
● Fase Hexagonal	● Transição de Fases
● Fase Lamelar	● Emulsão Instável

Figura 8: Diagramas de fases ternários MO/PG/tampão Tris. Visualização das misturas ao microscópio de luz polarizada após 24 horas e 7 dias, na temperatura ambiente e aumento de 200x.

Figura 9: Diagramas de fases ternários: (A) MO/PEI (12:1)/PG/tampão Tris, (B) MO/PEI (6:1)/PG/tampão Tris e (C) MO/PEI (3:1)/PG/tampão Tris. Visualização das misturas ao microscópio de luz polarizada após 24 horas e 7 dias, na temperatura ambiente e aumento de 200x.

Figura 10: Diagramas de fases ternários: (A) MO/OAM (24:1)/PG/tampão Tris, (B) MO/OAM (12:1)/PG/tampão Tris. Visualização das misturas ao microscópio de luz polarizada após 24 horas e 7 dias, na temperatura ambiente e aumento de 200x.

Através dos diagramas representados nas **Figuras 8, 9 e 10** é possível observar a formação de diversas fases líquido cristalinas e amplas regiões de emulsão instável, principalmente após 7 dias do preparo das formulações. A análise da **Figura 8** nos mostra que quando a concentração do tampão Tris é superior a 70 %, obtemos um gel transparente em equilíbrio com excesso de água que se mostra

isotrópico ao microscópio de luz polarizada, o qual pode ser caracterizado como fase cúbica com excesso de água. Também observamos esta fase quando a concentração do tampão Tris está entre 50-70 % e a concentração de PG é menor de 20 %. Esta capacidade da fase cúbica de co-existir em equilíbrio com excesso de água está documentada na literatura (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001). Após 7 dias, esta região foi caracterizada como fase cúbica com pontos birrefringentes. Já, na **Figura 9 A, B e C** a fase cúbica com excesso de água foi observada em concentrações de tampão Tris que variam de 70-90 %, abrangendo proporções de MO/PEI menores que 12, 10 e 6 % para a concentração de 70 % de tampão; 8, 6 e 4 % para a concentração de 80 % de tampão e; 4, 3 e 2 % para a concentração de 90 % de tampão, respectivamente. Proporções de MO/PEI superiores as mencionadas acima, promoveram a formação de fase hexagonal + água, e não houve a formação de sistemas líquido cristalinos para proporções ainda maiores de MO/PEI. Nas formulações obtidas com OAM (**Figura 10 A e B**) também observamos a formação de fase cúbica em excesso de água, a qual foi obtida em concentrações de tampão Tris de 60-90 %, abrangendo proporções de MO/OAM menores que 25 e 16 % para a concentração de 60 % de tampão, 11 e 6 % para concentração de 70 % de tampão, 18 e 9 % para concentração de 80 % de tampão e 5 e 3 % para a concentração de 90 % de tampão, respectivamente.

Os diagramas das **Figuras 9 A, B e 10** também mostram a presença de fase lamelar, caracterizada ao microscópio de luz polarizada pela visualização de cruzes de MALTA e cordões finos.

Também foi observada uma região de líquidos homogêneos e isotrópicos ao microscópio de luz polarizada, caracterizados como líquidos isotrópicos, os quais não se mantiveram estáveis, sendo observada a transição para emulsão ou emulsão instável em 7 dias. Nos diagramas da **Figura 9 A, B e C** esta região se forma em proporções de tampão Tris menor que 15, 10 e 5 % com proporções de MO/PEI que variam de 15-65 %, 8-65 % e 18-48 %, respectivamente. Nos diagramas com OAM (**Figura 10**) esta região se forma em proporções de tampão Tris menores que 40 %.

Outras regiões amplas nos diagramas são as emulsões instáveis e transição de fases. As emulsões instáveis apresentam duas fases distintas quando do repouso do sistema. Já a transição de fases é composta por uma mistura de água e gel e ao microscópio de luz polarizada apresenta-se como uma mistura de pontos isotrópicos,

anisotrópico e gotículas, esta fase é observada principalmente nos diagramas com maiores proporções de PEI (**Figura 9 B, C**).

Estes diagramas nos mostram que é possível a obtenção de sistemas fluidos formados por MO/PEI/PG/tampão Tris e MO/OAM/PG/tampão Tris que em contato com excesso de água podem se transformar em sistemas líquido cristalinos viscosos. Chang & Bodmeier (1998) relataram que fases líquido isotrópicas, as quais apresentam viscosidade semelhante a de líquidos, podem ser transformadas em fase cúbica após entrarem em contato com fluidos corporais, uma vez que a fase cúbica se forma em regiões com alto teor de solventes, como observado nos diagramas.

A transformação de fases menos viscosas em cúbica pode ser explicada através do fator de empacotamento. A mudança de fase lamelar em cúbica pelo aumento do conteúdo aquoso pode ser explicada pelo efeito da água no domínio polar da MO, uma vez que com o aumento de água os grupos polares da MO se movem mais livremente. Estes movimentos promovem uma desordem na cadeia hidrofóbica da MO, aumentando V_h . Como a interação dos grupos da cabeça polar é forte devido às pontes de hidrogênio, A_o tende a ser constante, desta forma, o fator de empacotamento aumenta, como determinado pela **Equação 1**, facilitando a transformação de fase lamelar para cúbica (AMAR-YULI; GARTI, 2005).

4.1.2. Avaliação *in vitro* da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água

A partir dos diagramas ternários selecionamos as formulações fluidas e homogêneas para o teste de geleificação *in vitro*. Estas formulações apresentam baixo teor de fase aquosa (tampão Tris) e como observado nos diagramas o aumento do teor de água promove a formação de fases mais viscosas como a cúbica e a hexagonal reversa (CHANG; BODMEIER, 1998; BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001).

A **Figura 11** mostra todas as formulações precursoras que foram escolhidas para o teste de geleificação. Todos os géis obtidos sem a incorporação de PEI ou OAM foram caracterizados como fase cúbica em excesso de água (**Figura 11 A**). Os géis obtidos com PEI apresentaram diferentes características: em baixas concentrações observamos a presença de pontos birrefringentes ao microscópio de luz polarizada, com o aumento da concentração de PEI o gel foi caracterizado como fase hexagonal, porém o aumento ainda maior da sua concentração não favoreceu a

formação de sistema líquido cristalino, formando emulsões (**Figura 11 B, C, D, E e F**). Das formulações precursoras escolhidas com a presença de OAM na proporção de MO/OAM 24:1, todos os géis formados foram caracterizados como birrefringentes em 24 horas e mantiveram esta característica por 7 dias, com exceção dos sistemas com proporções de MO/OAM superiores a 34,56:1,44, que em 7 dias foram caracterizadas como mistura de fase hexagonal e emulsão (**Figura 11 G e H**). Já as formulações precursoras escolhidas a partir do diagrama MO/OAM (12:1) não formaram gel *in vitro* no teste de geleificação (**Figura 11 I**).

A caracterização dos géis obtidos a partir das formulações precursoras incorporadas de PEI nos mostrou que a presença deste polímero em baixas concentrações favorece a formação de fase hexagonal, o que pode ser explicada considerando o fator de empacotamento. O PEI possivelmente interage com os domínios polares da MO através de pontes de hidrogênio, estas interações podem promover uma diminuição em A_o , favorecendo a formação de fase hexagonal. Este fenômeno também foi evidenciado em um estudo sobre a influência de polissacarídeos na transição de fases líquido cristalinas. Neste estudo foi demonstrado que a glicose, um composto hidrofílico, pode ter alterado a A_o através de fortes ligações de hidrogênio, de tal forma, que a curvatura da fase lamelar pode ser reduzida pela presença de glicose para se transformar em fase cúbica ou, similarmente, a curvatura da fase cúbica pode ser reduzida e se transformar em fase hexagonal (MEZZENGA *et al.*, 2005).

O aumento da concentração de PEI prejudica a formação de sistemas líquido cristalinos, o que pode ser devido às muitas pontes de hidrogênio, que podem atrapalhar a organização das estruturas em sistemas líquido cristalinos.

A presença de OAM também favorece a formação de gel de fase hexagonal. Uma possível explicação pode ser encontrada pela análise da estrutura da OAM (**Figura 3**). Como a OAM apresenta uma pequena região polar e uma grande cauda apolar, pode promover um aumento do fator de empacotamento por dois motivos: redução de A_o devido a ponte de hidrogênio da sua parte polar com o domínio polar da MO e aumento V_h devido a sua grande cauda apolar.

A mudança na formação de fases promovida pela incorporação do PEI e OAM nos sistemas está representada na **Figura 12** através das fotomicrografias obtidas no microscópio de luz polarizada.

Figura 12: Fotomicrografias por microscopia de luz polarizada dos géis obtidos a partir das formulações precursoras: MO/PG/tampão Tris 27:63:10 (p/p/p), MO/PEI/PG/tampão Tris 6,46:0,54:63:30 e 23,54:1,96:59,5:15 (p/p/p/p) e MO/OAM/PG/tampão Tris 8,16:0,34:76,5:15 (p/p/p/p) nos tempos de 24 horas e 7 dias. (A, B e C) Fase cúbica; (D, E, G e H) Fase hexagonal e (F) Emulsão. Aumento 200x.

Diferentes trabalhos demonstram que sistemas de fase hexagonal apresentam características interessantes como sistemas de liberação de ácidos nucleicos. Em um estudo para liberação de DNA, a fase hexagonal foi formada a partir da complexação de lipídeos catiônicos e neutros com DNA em solução aquosa (KOLTOVER *et al.*, 1998) e foi eficiente devido à rápida fusão e liberação do DNA após a adesão do sistema com vesículas aniônicas, que são modelos de membranas celulares (KOLTOVER *et al.*, 1998; DRUMMOND; FONG, 2000).

Desta caracterização por microscopia de luz polarizada, foram selecionadas as formulações precursoras líquidas e fluidas incorporadas de PEI ou OAM que formaram sistemas líquido cristalinos após contato com excesso de água para verificar a sua capacidade de complexação com siRNA. Com estas formulações precursoras escolhidas também foram refeitos os testes de geleificação *in vitro*, porém, as análises foram feitas em intervalos de tempo superiores e detalhados (24, 48, 72 horas e 7, 10 e 14 dias). A caracterização dos géis obtidos com MO/PEI/PG/tampão Tris e MO/OAM/PG/tampão Tris está descrita nas **Tabelas 1 e 2**, respectivamente. As formulações com concentrações superiores a 24% de MO/OAM foram excluídas devido a sua alta viscosidade.

Tabela 1: Características do gel formado a partir de formulações de MO/PEI/PG/tampão Tris com excesso de água, determinada por microscopia de luz polarizada em 24, 48, 72 horas e 7, 10 e 14 dias a temperatura ambiente.

% dos componentes da formulação precursora				Tempo	Identificação Estrutural do gel formado com excesso de água
MO	PEI	PG	tampão Tris		
6,46	0,54	63	30	24 – 72 h	Fase Cúbica com pontos birrefringentes
				7 – 14 d	Fase Hexagonal
7,38	0,62	72	20	24 – 72 h	Fase Hexagonal
15,69	1,31	68	15	7 – 14 d	Emulsão
				24 h – 7 d	Fase Hexagonal
7,85	0,65	76,5	15	10 – 14 d	Emulsão
				24 – 72 h	Fase Cúbica com pontos birrefringentes
5,57	0,93	58,5	35	7 – 14 d	Fase Hexagonal

7,29	1,21	76	15	24 h	Fase Hexagonal
7,71	1,29	81	10		
8,14	1,36	85,5	5		
16,62	1,38	72	10		
17,54	1,46	76	5		
23,54	1,96	59,5	15		
24,92	2,08	63	10		
26,31	2,19	66,5	5		

h: horas; d: dias.

Tabela 2: Características do gel formado a partir de formulações de MO/OAM/PG/tampão Tris com excesso de água, determinada por microscopia de luz polarizada em 24, 48, 72 horas e 7, 10 e 14 dias a temperatura ambiente.

% dos componentes da formulação precursora				Tempo	Identificação Estrutural do gel formado com excesso de água
MO	OAM	PPG	tampão Tris		
7,68	0,32	72	20	24h – 14d	Fase Hexagonal
8,16	0,34	76,5	15		
8,64	0,36	81	10		
9,12	0,38	85,5	5		
15,36	0,64	64	20		
16,32	0,68	68	15		
17,28	0,72	72	10		
23,04	0,96	56	20		
18,24	0,76	76	5	24h – 7d	Fase Hexagonal
				10 – 14d	Fase Hexagonal + Emulsão

h: horas; d: dias.

4.1.3. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionadas

A avaliação da eficiência de complexação foi feita por eletroforese baseado no método proposto por Tran *et al.* (2008). As **Figuras 13** e **14** mostram os resultados da eficiência de complexação com siRNA das formulações precursoras obtidas com PEI e OAM, respectivamente. As formulações foram aplicadas no gel de agarose 2 % com siRNA na concentração final de 10 μ M. Também foram avaliadas as formulações sem siRNA para verificar se os componentes das mesmas não apresentavam banda visível sob UV que pudesse interferir nos resultados. Como

controles foram utilizadas formulações sem a adição do polímero ou lipídeo catiônico. Em todas as corridas eletroforéticas foi aplicado um controle positivo de siRNA (siRNA em água DEPC na concentração de 10 μ M).

Figura 13: Eficiência de complexação das formulações precursoras MO/PG/tampão Tris (controle) e MO/PEI/PG/tampão Tris sem e com siRNA na concentração final de 10 μ M. Controle: 10 μ M de siRNA em água DEPC.

Figura 14: Eficiência de complexação das formulações precursoras MO/PG/tampão Tris (controle) e MO/OAM/PG/tampão Tris sem e com siRNA na concentração final de 10 μ M. Controle: 10 μ M de siRNA em água DEPC.

Todas as formulações com PEI e OAM foram capazes de complexarem o siRNA, o que não foi observado para as formulações controle, ou seja, não adicionadas de polímero ou lipídeo catiônico, as quais permitiram a liberação do siRNA. Tais resultados demonstram a importância da incorporação de PEI ou OAM nos diferentes sistemas propostos como carreadores de siRNA. Resultados semelhantes estão reportados na literatura (SCHROEDER *et al.*, 2010; VARKOUHI *et al.*, 2011). As irregularidades nas bandas das formulações com MO nas proporções de 24,92 e 26,31 para as formulações com PEI e 27,36 nas formulações com OAM podem ser explicadas devido a maior viscosidade dessas formulações, o que dificulta fisicamente a corrida do siRNA no gel.

Sistemas para liberação de siRNA devem ter carga residual positiva para formarem complexos com siRNA através de interações eletrostáticas e assim facilitar a sua entrada na célula e diminuir a sua degradação por nucleases (GHOSN *et al.*, 2010; GUNTHER *et al.*, 2011; VARKOUHI *et al.*, 2011; BEYERLE *et al.*, 2011; KREBS; ALSBERG, 2011). Uma das maneiras de se determinar esta carga superficial é a medida do potencial zeta (BEYERLE *et al.*, 2011, VARKOUHI *et al.*, 2011), porém devido as características de geleificação em excesso de água do sistema proposto, não é possível a medida da carga superficial por esta metodologia. Desta forma, uma alternativa para conhecermos a carga superficial

relativa dos sistemas em estudo é através da eletroforese. Neste experimento observa-se que as formulações com PEI ou OAM apresentam um residual de carga positivo uma vez que migraram para o pólo negativo, e as formulações sem a adição destes compostos catiônicos apresentam um residual de carga negativo migrando para o pólo positivo.

A **Figura 15** mostra nos diagramas de fases ternário as formulações que foram escolhidas para a continuação dos estudos, após o teste de geleificação *in vitro* e a eletroforese. Os critérios para escolha destes sistemas foram a formação de géis líquido cristalinos por mais de 24 horas e a capacidade de complexar siRNA. A formulação composta por MO/PEI/PG/tampão Tris na proporção 7,38:0,62:72:20 (p/p/p/p) foi excluída por ter concentração de MO semelhante a formulação composta de MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,65:76,5:15, porém apresentando menor estabilidade.

Referente às formulações incorporadas com OAM foram excluídas os sistemas com 20 % de tampão Tris por estarem no limite entre os sistemas líquido cristalinos e as emulsões instáveis.

Figura 15: Formulações selecionadas para a continuidade dos estudos.

4.1.4. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas

Os estudos de absorção de água foram realizados com as quatro formulações escolhidas contendo PEI e as seis contendo OAM. A taxa de absorção de água e a fase líquido cristalina formada por anfífilas que absorvem água, tais como a MO, podem afetar a cinética de liberação de fármacos, portanto, o estudo de absorção de água é essencial durante o desenvolvimento de sistemas com geleificação *in situ*.

(CHANG; BODMEIER, 1997b). As **Figuras 16 e 17** mostram o aumento do peso das membranas de diálise com as formulações contendo PEI e OAM, respectivamente, em função do tempo. Os parâmetros associados à cinética de intumescimento (W_0 : taxa inicial de absorção; W_∞ : absorção máxima de água) obtidos teoricamente também estão demonstrados nas figuras. Cada formulação foi comparada com o seu controle, ou seja, com as formulações sem a adição do polímero ou lipídeo catiônico.

Figura 17: Absorção de água pela membrana de diálises com diferentes formulações com OAM em função do tempo. (A) Durante todo o intervalo de tempo avaliado. (B) Durante as duas primeiras horas. * $p < 0,05$ (t-test) ($n=5$, $\pm$ E.P.M.). Parâmetros da cinética de intumescimento: W_0 (g de água absorvida / g de formulação x hora); W_∞ (g de água absorvida / g de formulação).

A análise das **Figuras 16 e 17** permite concluir que a absorção inicial de água ocorre rapidamente para todas as formulações analisadas e após algumas horas esta absorção se estabiliza alcançando o equilíbrio de teor aquoso. Esta rápida absorção de água indica que a formação de fases líquido cristalinas viscosas, tais como fase cúbica e hexagonal, é um processo rápido como demonstrado por outros estudos (CHANG; BODMEIER, 1997b; LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005; RIZWAN *et al.*, 2009).

As formulações de MO/PEI nas proporções de 5,57:0,93, 7,85:0,65 e 15,69:1,31 absorveram mais água do que seus respectivos controles. Isto se deve a presença do PEI na formulação, que devido à forte protonação das aminas presentes em sua molécula induz um gradiente osmótico (GUNTHER *et al.*, 2011). A maior absorção de água destas formulações também pode ser evidenciada analisando a absorção máxima de água (W_{∞}) determinada pela cinética de intumescimento. As formulações controle com MO 5,57, 7,85 e 15,69 absorveram o máximo de 0,13, 0,10 e 0,09 g de água/g de formulação, enquanto que estas formulações com a adição de PEI absorveram 0,36, 0,37 e 0,25 g de água/g de formulação, respectivamente.

As formulações de MO/OAM 8,64:0,36, 9,12:0,38 e 16,32:0,68 também apresentaram, em alguns intervalos de tempo, absorção de água superior aos seus controles, o que também pode ser explicado pela protonação da amina presente em sua molécula. Porém, devido a presença de apenas um grupamento amina em sua molécula a absorção de água não é muito influenciada pela presença deste lipídeo no sistema, como podemos observar nas formulações com maiores porcentagens de OAM (MO/OAM 17,28:0,72 e 18,24:0,76), que não tiveram absorção significativamente maior que seus respectivos controles.

Para determinar a cinética de absorção de água foram plotados dois gráficos: com a cinética de primeira e segunda ordem de intumescimento versus tempo para as formulações com PEI e OAM (**Figura 18 e 19**, respectivamente). A partir destes gráficos determinou-se que a cinética que melhor descreve o intumescimento dos sistemas com e sem PEI ou OAM em função do tempo é a de segunda ordem, uma vez que uma relação linear foi obtida quando os dados foram relacionados como t/w versus t , de acordo com a **Equação 3** apresentada no item 3.2.1.4. Estes resultados corroboram com o descrito por outros pesquisadores que avaliaram o perfil de intumescimento da MO (CHANG; BODMEIER, 1997b; LARA;

BENTLEY; COLLETT, 2005; RIZWAN *et al.*, 2009).

Figura 18: Cinética de intumescimento de diferentes formulações com PEI e seus controles, t/W versus tempo (Cinética de segunda ordem) e $\ln W_{\infty} / (W_{\infty} - W)$ versus tempo (Cinética de primeira ordem).

Figura 19: Cinética de intumescimento de diferentes formulações com OAM e seus controles, t/W versus tempo (Cinética de segunda ordem) e $\ln W_{\infty} / (W_{\infty} - W)$ versus tempo (Cinética de primeira ordem).

Como demonstrado por Lee *et al.* (2003), os métodos usados para determinar a cinética de absorção influenciam os resultados obtidos. Portanto, os resultados apresentados podem ter desvios em relação ao que ocorrerá subcutaneamente nos fluidos biológicos, mas nos permitem analisar a rapidez de formação dos sistemas e nos mostram como a presença de PEI ou OAM interfere no comportamento das mesofases.

Os resultados obtidos a partir do desenvolvimento e caracterização das formulações propostas foram de fundamental importância na avaliação e determinação do potencial de sistemas formados por MO/PG/tampão Tris e PEI ou OAM para administração subcutânea de fármacos.

Nesta etapa inicial foi possível determinar em que proporção de cada componente obtém-se um sistema inicialmente fluido que ao entrar em contato com excesso de água forma fases líquido cristalinas mais viscosas, possibilitando a liberação controlada do ativo incorporado.

Adicionalmente, os estudos desenvolvidos até o momento demonstram a importância da incorporação de PEI ou OAM para que as formulações sejam capazes de complexar o siRNA, protegendo-o da degradação e favorecendo sua entrada nas células.

Assim, diante dos resultados apresentados iniciou-se a otimização das formulações selecionadas para aplicação *in vivo*. Para os sistemas incorporados com PEI foram mantidos os mesmos pré-selecionados para os estudos de absorção de água descritos na **Figura 15**. Já para aqueles com OAM, foi selecionada a formulação MO/OAM/PG/tampão Tris 16,32:0,68:68:15 (p/p/p/p), que apresentou maior absorção de água e a 7,85:0,65:76,5:15 que contém metade da proporção de MO e OAM, nos permitindo avaliar a influência destes componentes.

4.2. Otimização dos sistemas obtidos para a administração subcutânea de siRNA

4.2.1. Adequação das formulações com capacidade de formação de gel *in situ*

Diante do descrito na literatura de que o PEI é citotóxico dependendo do seu peso molecular, estrutura e concentração (LIU *et al.*, 2011) e de que sistemas formados com lipídeos catiônicos têm sua eficácia limitada devido a sua toxicidade (OZPOLAT; SOOD; LOPEZ-BERESTEIN, 2010) reduzimos a proporção do polímero

e lipídeo catiônico em 50, 75 e 90 %. As formulações precursoras obtidas foram então caracterizadas por microscopia de luz polarizada como líquido isotrópico no tempo de 24 horas.

4.2.2. Determinação da eficiência de complexação com siRNA e da carga superficial relativa das formulações precursoras selecionadas

As formulações também foram avaliadas quanto a sua capacidade de complexar com siRNA (10 μ M) por eletroforese, conforme descrito no item 3.2.2.2. (Figura 20).

Figura 20: Eficiência de complexação de diferentes formulações precursoras (A) MO/PEI/PG/tampão Tris e (B) MO/OAM/PG/tampão Tris. Controle: 10 μ M de siRNA em água DEPC.

A análise da eletroforese nos mostra que as formulações com PEI foram capazes de complexar com siRNA mesmo em baixas proporções (0,054; 0,065; 0,093 e 0,131) deste polímero. Já para os sistemas com OAM observa-se uma diminuição desta capacidade dependente da concentração de lipídeo no sistema. Assim, no caso da OAM não foram utilizadas as formulações com as proporções reduzidas nos estudos futuros.

4.2.3. Avaliação *in vitro* da geleificação das formulações precursoras na presença de excesso de água

As formulações com as concentrações de PEI reduzidas foram então avaliadas pelo teste de geleificação *in vitro* e o gel obtido analisado por microscopia de luz polarizada nos tempos de 24, 48 e 72 horas e 7, 10 e 14 dias. A caracterização dos géis obtidos está apresentada na **Tabela 3**.

Tabela 3: Características do gel formado a partir de formulações de MO/PEI/PG/tampão Tris com excesso de água, determinada por microscopia de luz polarizada em 24, 48, 72 horas e 7, 10 e 14 dias a temperatura ambiente.

% dos componentes da formulação				Tempo	Identificação Estrutural do gel formado com excesso de água
MO	PEI (redução do PEI em %)	PG	tampão Tris		
6,46	0,54	63	30	24 - 72 h	Fase Cúbica com pontos anisotrópicos
6,46	0,27 (50 %)	63	30,27	7 - 14 d	Fase Hexagonal
6,46	0,135 (75 %)	63	30,405		
6,46	0,054 (90 %)	63	30,486	24 h - 14 d	Fase Cúbica
5,57	0,93	58,5	35	24 - 72 h	Fase Cúbica com pontos anisotrópicos
5,57	0,465 (50 %)	58,5	35,465	7 - 14 d	Fase Hexagonal
5,57	0,233 (75 %)	58,5	35,698		
5,57	0,093 (90 %)	58,5	35,837	24 h - 14 d	Fase Cúbica
7,85	0,65	76,5	15	24 h - 7 d	Fase Hexagonal
7,85	0,325 (50 %)	76,5	15,325	10 - 14 d	Emulsão
7,85	0,163 (75 %)	76,5	15,488	24 - 72 h	Fase cúbica
				7 - 14 d	Fase Hexagonal
				24 h - 14 d	Fase Cúbica
15,69	1,31	68	15	24 - 72 h	Fase Hexagonal
				7 - 14 d	Emulsão
				24 - 14 d	Fase Hexagonal
15,69	0,328 (75 %)	68	15,983	24 h - 14 d	Fase Cúbica
15,69	0,131 (90 %)	68	16,171		

h: horas; d: dias

As análises mostraram que para os sistemas MO/PEI nas proporções de 6,46:0,54 e 5,57:0,93 não houve alteração na fase líquido cristalina quando reduzido o polímero em 50 e 75 %. Já para os sistemas contendo MO/PEI nas proporções 7,85:0,65 somente a redução em 50 % manteve a fase. Finalmente para o sistema

MO/PEI 15,69:1,31 foi observada alteração de fase para todas as proporções avaliadas.

Vale ressaltar que para todas as formulações a redução em 90 % do polímero resultou em fase cúbica, a mesma observada para o sistema sem adição de PEI.

No entanto, tais alterações não justificariam a exclusão de nenhum dos sistemas avaliados, já que foram obtidas fases líquido cristalinas interessantes para continuidade dos estudos. Desta forma, diante da necessidade da redução do número de sistemas a serem avaliados nos estudos *in vivo* e considerando que o trabalho tem como objetivo avaliar e comparar o efeito da incorporação de diferentes carreadores catiônicos foram selecionados os sistemas contendo MO em proporções semelhantes daqueles incorporados de OAM. Com relação à proporção de PEI, foram selecionados aqueles com a maior e menor proporção do polímero o que possibilitaria, além da avaliação da influência deste carreador, investigar também a influência da fase líquido cristalina formada.

4.2.4. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado nas formulações precursoras selecionadas

A estabilidade do siRNA complexado nas formulações precursoras foi determinada pelo ensaio de descomplexação com heparina pelo método proposto por SHEN *et al.* (2011). A avaliação da estabilidade do siRNA nas diferentes formulações está mostrada na **Figura 21**. Somente para a formulação MO/PEI 15,69:1,31, o volume de 10 µL de heparina a 5.000 U.I./mL não foi suficiente para promover a descomplexação, a qual ocorreu com o volume de 20 µL.

Figura 21: Ensaio de descomplexação do siRNA das formulações precursoras usando heparina. Controle: siRNA 10 μ M em água DEPC. Hep.: heparina.

Como podemos observar as formulações complexadas com siRNA não apresentaram bandas sob luz UV. Após ser adicionado a heparina à estas formulações houve a descomplexação do siRNA promovida pela carga negativa do agente de descomplexação utilizado (heparina), demonstrando que o siRNA permanece estável durante a complexação.

Os estudos de avaliação da estabilidade do siRNA complexado ou encapsulado nos sistemas normalmente é feito utilizando o SDS como agente descomplexante (TRAN *et al.*, 2008), porém no presente estudo verificou-se que o SDS apresentava banda que interferia nos resultados obtidos. Desta forma, optou-se pela heparina, que é usada por Lee *et al.* (2008) e Shen *et al.* (2011) na avaliação da capacidade dos sistemas em manter o siRNA complexado.

4.2.5. Avaliação da absorção de água e determinação da cinética de intumescimento das formulações precursoras selecionadas

Foram realizados estudos de absorção de água das novas formulações MO/PEI 7,85:0,065 e 15,69:0,131. A **Figura 22** mostra o aumento do peso das membranas de diálise com as formulações contendo diferentes proporções de PEI em função do tempo. Também estão demonstrados os parâmetros associados à cinética de intumescimento (W_0 e W_∞) obtidos teoricamente. Cada formulação foi comparada com o seu controle (formulação sem adição de PEI) e também com a formulação com PEI na proporção dez vezes maior.

Figura 22: Absorção de água pela membrana de diálises com diferentes formulações em função do tempo. (A) Durante todo o intervalo de tempo avaliado. (B) Durante as duas primeiras horas. * $p < 0,05$ (t-test) ($n=5$, $\pm$ E.P.M.). Parâmetros da cinética de intumescimento: W_o (taxa inicial de absorção (g de água absorvida / g de formulação x hora)); W_{∞} (absorção máxima de água (g de água absorvida / g de formulação)).

A redução na concentração de PEI em 90 % fez com que os sistemas se comportassem semelhantes aos sistemas sem a adição de PEI, confirmando a discussão de que o polímero catiônico devido aos seus grupos amina promove uma maior absorção de água decorrente do gradiente osmótico promovido pela protonação destes grupamentos. A formulação MO/PEI 15,69:0,131 em relação a MO 15,69 (sem PEI) não apresentou diferenças estatísticas na absorção de água, já em relação a MO/PEI 15,69:1,31 houve diferenças estatísticas a partir de 2 horas. A

formulação MO/PEI 7,85:0,065 em relação à MO 7,85 apresentou diferenças estatísticas na absorção de água a partir de 8 horas e em relação à MO/PEI 7,85:0,65 a partir de uma hora.

A cinética de absorção de água foi determinada plotando os gráficos de cinética de primeira e segunda ordem de intumescimento versus tempo que estão apresentados na **Figura 23**. A cinética destas novas formulações foi determinada como sendo de segunda ordem, da mesma maneira das analisadas no item 4.1.4.

Figura 23: Cinética de intumescimento de diferentes formulações com PEI e seus controles, t/w versus tempo (Cinética de segunda ordem) e $\ln W_{\infty} / (W_{\infty} - W)$ versus tempo (Cinética de primeira ordem).

4.2.6. Caracterização dos géis obtidos após o intumescimento por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Os géis obtidos a partir das formulações precursoras selecionadas foram analisados por SAXS para a caracterização da estrutura líquido cristalina. Também se avaliou a influência da incorporação de 10 μM de siRNA, do PEI e da OAM na estrutura líquido cristalina dos sistemas obtidos.

As **Figuras 24 e 25** mostram os resultados obtidos das medidas de SAXS dos géis obtidos a partir das formulações com PEI e OAM, respectivamente, com e

sem siRNA.

Figura 24: SAXS dos géis obtidos a partir de formulações precursoras de MO/PG/tampão Tris e MO/PEI/PG/tampão Tris sem e com a adição de 10 μ M siRNA.

Figura 25: SAXS dos géis obtidos a partir de formulações precursoras de MO/PG/tampão Tris e MO/OAM/PG/tampão Tris sem e com a adição de 10 μM siRNA.

Os picos de difração de baixo ângulo podem ser utilizados para a identificação de fases líquido cristalinas (HELLEDI; SCHUBERT, 2001; AMAR-YULI; GARTI, 2005; LOPES *et al.*, 2006a; RIZWAN *et al.*, 2009; DONG; BOYD, 2011; PHAN *et al.*, 2011). Através dos ângulos de difração pode-se calcular as distâncias entre os planos formados por micelas ordenadas, que seguem razões características de acordo com o tipo de fase, conforme mostrado na **Tabela 4**. Diferenças no espalhamento de fundo, ou *background*, das amostras, podem ocorrer por pequenos desvios nos valores da transmissão, visto que a intensidade depende exponencialmente da transmissão, ou pela existência de pequenas bolhas no suporte de amostra. A escala logarítmica dos gráficos acentua as diferenças no espalhamento de fundo.

Tabela 4: Razões entre as distâncias interplanares e tipo de estrutura líquido cristalina (LINDBLOM; RILFORS, 1989).

Estrutura	Grupo espaçador	Razões entre as distâncias interplanares
Fase hexagonal (H_{II})	—	$\sqrt{3}: \sqrt{4}: \sqrt{7}$
Fase cúbica		
- Giróide (G)	$Ia3d$	$\sqrt{3}: \sqrt{4}: \sqrt{7}: \sqrt{10}: \sqrt{11}$
- Diamante (D)	$Pn3m$	$\sqrt{2}: \sqrt{3}: \sqrt{4}: \sqrt{6}: \sqrt{8}: \sqrt{9}: \sqrt{10}$
	$Pm3n$	$\sqrt{2}: \sqrt{4}: \sqrt{5}: \sqrt{6}: \sqrt{8}$
- Primitiva (P)	$Im3m$	$\sqrt{2}: \sqrt{4}: \sqrt{6}: \sqrt{8}: \sqrt{10}: \sqrt{12}: \sqrt{14}$

A análise dos picos de difração forneceu as razões entre as distâncias interplanares e permitiu determinar o parâmetro de rede (a), assim como identificar o tipo de fase líquido cristalina dos géis obtidos a partir das formulações precursoras com PEI e OAM, conforme apresentado nas **Tabelas 5 e 6**, respectivamente.

Tabela 5: Vetor de espalhamento, distâncias interplanares, média do parâmetro de rede e estruturas líquido cristalinas determinadas por SAXS dos géis obtidos a partir de formulações precursoras de MO/PG/tampão Tris e MO/PEI/PG/tampão Tris sem e com a adição de 10 μM siRNA.

Amostra	q (nm^{-1})	d (nm)	Razão	Média do parâmetro de rede (nm)	Estrutura
MO/PG/tampão Tris 7,85:76,5:15,65	0,9248	6,7940	1:1	$a_{c1} = 6,793 \pm 0,013$ $a_{c2} = 5,543 \pm 0,011$	Cúbica D + G
	1,1346	5,5377	1:1		Cúbica D
	1,3051	4,8144	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,6067	3,9107	1: $\sqrt{2}$; 1: $\sqrt{3}$		Cúbica D; D + G
	1,8558	3,3857	1: $\sqrt{4}$		Cúbica D + G
	1,9607	3,2045	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,0656	3,0418	1: $\sqrt{5}$		Cúbica D
	2,2623	2,7773	1: $\sqrt{4}$; 1: $\sqrt{6}$		Cúbica D
	2,4459	2,5689	1: $\sqrt{7}$		Cúbica G
	2,6950	2,3314	~1: $\sqrt{8}$, $\sqrt{9}$		Cúbica D
MO/PG/tampão Tris 7,85:76,5:15,65 + 10 μM siRNA	0,9510	6,6066	1:1	$a_{c1} = 6,610 \pm 0,014$ $a_{c2} = 5,404 \pm 0,007$	Cúbica D + G
	1,1608	5,4126	1:1		Cúbica D
	1,3444	4,6735	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,6460	3,8172	1: $\sqrt{2}$; 1: $\sqrt{3}$		Cúbica D; D + G
	1,9083	3,2926	1: $\sqrt{4}$		Cúbica D + G
	2,0132	3,1211	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,1181	2,9665	1: $\sqrt{5}$		Cúbica D
	2,3279	2,6991	1: $\sqrt{4}$; 1: $\sqrt{6}$		Cúbica D
	2,5114	2,5018	1: $\sqrt{7}$		Cúbica G
	2,7737	2,2653	~1: $\sqrt{8}$, $\sqrt{9}$		Cúbica D

Continuação da Tabela 5

MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,065:76,5:15,585	0,9117	6,8917	1:1	$a_{c1} = 6,933 \pm 0,026$ $a_{c2} = 5,672 \pm 0,010$	Cúbica D + G
	1,1084	5,6687	1:1		Cúbica D
	1,2789	4,9131	1:√2		Cúbica D
	1,5673	4,0088	1:√2		Cúbica D
	1,8165	3,4590	1:√4		Cúbica D + G
	1,9214	3,2702	1:√3		Cúbica D
	2,0263	3,1009	1:√5		Cúbica D
	2,2099	2,8433	1:√4		Cúbica D
	2,3934	2,6252	1:√7		Cúbica G
	2,6295	2,3895	~1:√8,√9		Cúbica D
MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,065:76,5:15,585 + siRNA 10 μM.	0,9248	6,7940	1:1	$a_{c1} = 6,793 \pm 0,014$ $a_{c2} = 5,534 \pm 0,017$	Cúbica D + G
	1,1346	5,5377	1:1		Cúbica D
	1,3051	4,8144	1:√2		Cúbica D
	1,6067	3,9107	1:√2; 1:√3		Cúbica D; D + G
	1,8558	3,3857	1:√4		Cúbica D + G
	1,9738	3,1833	1:√3		Cúbica D
	2,0656	3,0418	1:√5		Cúbica D
	2,2623	2,7773	1:√4; 1:√6		Cúbica D
	2,4459	2,5689	1:√7		Cúbica G
	2,6950	2,3314	~1:√8,√9		Cúbica D
MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,65:76,5:15	0,7544	8,3293	1:1	$a_{c1} = 8,312 \pm 0,031$ $a_{c2} = 6,351 \pm 0,016$ $a_H = 5,980$	Cúbica D + G
	0,9904	6,3442	1:1		Cúbica D
	1,0691	5,8774	1:√2		Cúbica D
	1,2133	5,1786	1:1		Interstício
	1,3051	4,8144	1:√3		Hexagonal
	1,3969	4,4980	1:√2		Cúbica D + G
	1,7116	3,6710	1:√3		Cúbica D
	1,9738	3,1833	1:√4		Cúbica D
	2,0105	3,1252	1:√7		Cúbica G
	2,4328	2,5827	1:√6		Cúbica D
MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,65:76,5:15 + siRNA 10 μM	0,7675	8,1870	1:1	$a_{c1} = 8,158 \pm 0,040$ $a_{c2} = 6,517$ $a_H = 5,851 \pm 0,012$	Cúbica D
	0,9642	6,5168	1:1		Cúbica D
	1,0953	5,7366	1:√2		Cúbica D
	1,2395	5,0690	1:1		Hexagonal
	1,3313	4,7196	1:√3		Cúbica D
	2,1443	2,9302	1:√3		Hexagonal
	2,4852	2,5282	1:√4		Hexagonal
MO/PG/tampão Tris 15,69:68:16,31	0,9379	6,6990	1:1	$a_{c1} = 6,688 \pm 0,016$ $a_{c2} = 5,463 \pm 0,016$	Cúbica D + G
	1,1477	5,4744	1:1		Cúbica D
	1,3313	4,7196	1:√2		Cúbica D
	1,6329	3,8479	1:√2; 1:√3		Cúbica D; D + G
	1,8820	3,3385	1:√4		Cúbica D + G
	1,9869	3,1622	1:√3		Cúbica D
	2,0918	3,0037	1:√5		Cúbica D
	2,3016	2,7299	1:√4; 1:√6		Cúbica D
	2,4852	2,5282	1:√7		Cúbica G
	2,7344	2,2979	~1:√8,√9		Cúbica D

Continuação da Tabela 5

MO/PG/tampão Tris 15,69:68:16,31 + siRNA 10 μ M	0,9510	6,6066	1:1	$a_{c1} = 6,619 \pm 0,011$ $a_{c2} = 5,404 \pm 0,007$	Cúbica D + G
	1,1608	5,4126	1:1		Cúbica D
	1,3444	4,6735	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,6460	3,8172	1: $\sqrt{2}$; 1: $\sqrt{3}$		Cúbica D; D + G
	1,8952	3,3154	1: $\sqrt{4}$		Cúbica D + G
	2,0132	3,1211	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,1181	2,9665	1: $\sqrt{5}$		Cúbica D
	2,3279	2,6991	1: $\sqrt{4}$; 1: $\sqrt{6}$		Cúbica D
	2,5114	2,5018	1: $\sqrt{7}$		Cúbica G
	2,7606	2,2760	$\sim 1:\sqrt{8}, \sqrt{9}$		Cúbica D
MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:0,131:68:16,179	0,9248	6,7940	1:1	$a_{c1} = 6,765 \pm 0,015$ $a_{c2} = 5,526 \pm 0,010$	Cúbica D + G
	1,1346	5,5377	1:1		Cúbica D
	1,3182	4,7665	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,6067	3,9107	1: $\sqrt{2}$; 1: $\sqrt{3}$		Cúbica D; D + G
	1,8558	3,3857	1: $\sqrt{4}$		Cúbica D + G
	1,9738	3,1833	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,0787	3,0226	1: $\sqrt{5}$		Cúbica D
	2,2754	2,7613	1: $\sqrt{4}$; 1: $\sqrt{6}$		Cúbica D
	2,4590	2,5552	1: $\sqrt{7}$		Cúbica G
	2,7081	2,3201	$\sim 1:\sqrt{8}, \sqrt{9}$		Cúbica D
MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:0,131:68:16,179 + siRNA 10 μ M.	0,9379	6,6990	1:1	$a_{c1} = 6,679 \pm 0,012$ $a_H = 6,321 \pm 0,020$	Cúbica D + G
	1,1477	5,4744	1:1		Hexagonal
	1,3313	4,7196	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,6329	3,8479	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D + G
	1,8820	3,3385	1: $\sqrt{4}$		Cúbica D + G
	2,0001	3,1415	1: $\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,1050	2,9850	1: $\sqrt{5}$		Cúbica D
					Hexagonal;
	2,3016	2,7299	1: $\sqrt{4}$; 1: $\sqrt{6}$		Cúbica D
	2,4852	2,5282	1: $\sqrt{7}$		Cúbica G
	2,7475	2,2869	$\sim 1:\sqrt{8}, \sqrt{9}$		Cúbica D
MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:1,31:68:15	0,8199	7,6633	1:1	$a_c = 7,708 \pm 0,040$ $a_H = 5,673 \pm 0,012$	Cúbica D
	1,1477	5,4744	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,2789	4,9131	1:1		Hexagonal
	1,4100	4,4562	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,2230	2,8265	1: $\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,5639	2,4506	1: $\sqrt{4}$		Hexagonal
MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:1,31:68:15 + siRNA 10 μ M	0,8199	7,6633	1:1	$a_c = 7,653 \pm 0,008$ $a_H = 5,602 \pm 0,014$	Cúbica D
	1,1608	5,4126	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,2920	4,8633	1:1		Hexagonal
	1,4231	4,4152	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,0132	3,1211	1: $\sqrt{6}$		Cúbica D
	2,2492	2,7935	1: $\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,5901	2,4258	1: $\sqrt{4}$		Hexagonal

 a_H : média do parâmetro de rede da estrutura hexagonal a_c : média do parâmetro de rede da estrutura cúbica

Cúbica D: Fase cúbica D (Pn3m e Pm3n)

Cúbica G: Fase cúbica G (Ia3d)

 q : vetor de espalhamento d : distâncias interplanares

Resultados são representados como média $\pm$ E.P.M.

Tabela 6: Vetor de espalhamento, distâncias interplanares, média do parâmetro de rede e estruturas líquido-cristalinas determinadas por SAXS dos géis obtidos a partir de formulações precursoras de MO/PG/tampão Tris e MO/OAM/PG/tampão Tris sem e com a adição de 10 μ M siRNA.

Amostra	q (nm ⁻¹)	d (nm)	Razão	Média do parâmetro de rede (nm)	Estrutura
MO/PG/tampão Tris 8,16:76,5:15,34	0,9248	6,7940	1:1	$a_{c1} = 6,825 \pm 0,017$ $a_{c2} = 5,588 \pm 0,011$	Cúbica D + G
	1,1215	5,6025	1:1		Cúbica D
	1,3051	4,8144	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,5936	3,9429	1: $\sqrt{2}$; 1: $\sqrt{3}$		Cúbica D; D + G
	1,8427	3,4098	1: $\sqrt{4}$		Cúbica D + G
	1,9476	3,2261	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,0525	3,0612	1: $\sqrt{5}$		Cúbica D
			1: $\sqrt{4}$,		Cúbica D
	2,2492	2,7935	1: $\sqrt{6}$		
	2,4328	2,5827	1: $\sqrt{7}$		Cúbica G
	2,6819	2,3428	$\sim 1:\sqrt{8}, \sqrt{9}$		Cúbica D
MO/PG/tampão Tris 8,16:76,5:15,34 + siRNA 10 μ M	0,9510	6,6066	1:1	$a_{c1} = 6,619 \pm 0,011$ $a_{c2} = 5,404 \pm 0,007$	Cúbica D + G
	1,1608	5,4126	1:1		Cúbica D
	1,3444	4,6735	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,6460	3,8172	1: $\sqrt{2}$; 1: $\sqrt{3}$		Cúbica D; D + G
	1,8952	3,3154	1: $\sqrt{4}$		Cúbica D + G
	2,0132	3,1211	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,1181	2,9665	1: $\sqrt{5}$		Cúbica D
	2,3279	2,6991	1: $\sqrt{4}$; 1: $\sqrt{6}$		Cúbica D
	2,5114	2,5018	1: $\sqrt{7}$		Cúbica G
	2,7606	2,2760	$\sim 1:\sqrt{8}, \sqrt{9}$		Cúbica D
MO/OAM/PG/tampão Tris 8,16:0,34:76,5:15	1,3182	4,7665	1:1	$a_H = 5,515 \pm 0,010$	Hexagonal
	2,2754	2,7613	1: $\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,6295	2,3895	1: $\sqrt{4}$		Hexagonal
MO/OAM/PG/tampão Tris 8,16:0,34:76,5:15 + siRNA 10 μ M	1,3051	4,8144	1:1	$a_H = 5,553 \pm 0,007$	Hexagonal
	2,2623	2,7773	1: $\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,6163	2,4015	1: $\sqrt{4}$		Hexagonal
MO/PG/tampão Tris 16,32:68:15,68	0,9379	6,6990	1:1	$a_{c1} = 6,722 \pm 0,012$ $a_{c2} = 5,482 \pm 0,008$	Cúbica D + G
	1,1477	5,4744	1:1		Cúbica D
	1,3182	4,7665	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,6198	3,8790	1: $\sqrt{2}$; 1: $\sqrt{3}$		Cúbica D; D + G
	1,8689	3,3619	1: $\sqrt{4}$		Cúbica D + G
	1,9869	3,1622	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,0918	3,0037	1: $\sqrt{5}$		Cúbica D
	2,2885	2,7455	1: $\sqrt{4}$; 1: $\sqrt{6}$		Cúbica D
	2,4721	2,5416	1: $\sqrt{7}$		Cúbica G
	2,7212	2,3089	$\sim 1:\sqrt{8}, \sqrt{9}$		Cúbica D

Continuação da Tabela 6

MO/PG/tampão Tris 16,32:68:15,68 + siRNA 10 μ M	0,9510	6,6066	1:1	$a_{c1} = 6,593 \pm 0,013$ $a_{c2} = 5,362 \pm 0,009$	Cúbica D + G
	1,1740	5,3521	1:1		Cúbica D
	1,3444	4,6735	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,6591	3,7871	1: $\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,9083	3,2926	1: $\sqrt{4}$		Cúbica D + G
	2,0263	3,1009	1: $\sqrt{3}$		Cúbica D
	2,1312	2,9482	1: $\sqrt{5}$		Cúbica D
	2,3410	2,6840	1: $\sqrt{4}$; 1: $\sqrt{6}$		Cúbica D
	2,5246	2,4888	1: $\sqrt{7}$		Cúbica G
	2,7737	2,2653	~1: $\sqrt{8}$, $\sqrt{9}$		Cúbica D
MO/OAM/PG/tampão Tris 16,32:0,68:68:15	1,3838	4,5407	1:1	$a_H = 5,250 \pm 0,007$	Hexagonal
	2,3934	2,6252	1: $\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,7606	2,2760	1: $\sqrt{4}$		Hexagonal
MO/OAM/PG/tampão Tris 16,32:0,68:68:15 + siRNA 10 μ M	1,3969	4,4980	1:1	$a_H = 5,207 \pm 0,014$	Hexagonal
	2,4065	2,6109	1: $\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,7868	2,2546	1: $\sqrt{4}$		Hexagonal

a_H : média do parâmetro de rede da estrutura hexagonal

a_C : média do parâmetro de rede da estrutura cúbica

Cúbica D: Fase cúbica D (Pn3m e Pm3n)

Cúbica G: Fase cúbica G (Ia3d)

q : vetor de espalhamento

d: distâncias interplanares

Resultados são representados como média $\pm$ E.P.M.

A incorporação de aditivos aos sistemas líquido cristalinos pode ter como objetivo alterar a auto-organização dos lipídeos e, conseqüentemente, controlar a estrutura da fase formada. Essas alterações podem manifestar-se em completa mudança de fase ou apenas em variações no parâmetro de rede da estrutura (PHAN *et al.*, 2011). A análise por SAXS dos géis líquido cristalinos comprova que a adição de componentes (PEI ou OAM ou siRNA) altera o cristal líquido obtido, como observado por microscopia de luz polarizada, ou o parâmetro de rede da estrutura.

A identidade dos géis formados sem a adição do polímero ou lipídeo catiônico caracterizado por microscopia de luz polarizada como fase cúbica foi comprovada por SAXS. Também observamos que a adição de siRNA (10 μ M) não alterou a fase obtida. Para os géis sem PEI ou OAM foi possível observar a presença de mistura de fase cúbica do tipo D e G. Devemos considerar que a MO utilizada não é pura, sendo composta de 67,5 % de monoleato de glicerila e 18,7 % de monolinoleato de glicerila, que podem influenciar o tipo de fase formada (CHANG; BODMEIER, 1997a). A maioria das fases formadas na presença de MO é do tipo G, porém a presença de outros componentes favorecem a mistura de fases G e D (CABOI *et al.*, 2001), como foi observado no presente trabalho.

A adição do polímero catiônico PEI em baixas concentrações (0,065 e 0,131) não alterou a fase obtida como observado por microscopia de luz polarizada, sendo caracterizados como fase cúbica. A adição de siRNA ao sistema MO/PEI 15,69:0,131 favoreceu a obtenção de mistura de fase cúbica com hexagonal.

Com relação à adição de maiores proporções de PEI (0,65 e 1,31), a indexação dos picos de difração indica a formação de fase cúbica com interstício de fase hexagonal para o sistema MO/PEI 7,85:0,65 e a formação de fase cúbica misturada à fase hexagonal para o sistema MO/PEI 15,69:1,31, embora ao microscópio de luz polarizada observamos nestes sistemas estrias coloridas que são textura característica de fase hexagonal. A adição de siRNA ao primeiro sistema favoreceu a formação de fase cúbica junto com fase hexagonal, enquanto para o segundo sistema não alterou a fase obtida.

A identidade dos géis formados com a adição de OAM, caracterizado por microscopia de luz polarizada como fase hexagonal, foi também comprovada por SAXS.

A adição de siRNA e de PEI em baixas concentrações não promoveu uma alteração de fase, porém foram observadas variações no parâmetro de rede da estrutura.

O parâmetro de rede representa a distância entre os centros das micelas ordenadas da fase líquido cristalina, desta forma, obtem-se informações importantes sobre a estrutura interna dos cristais líquidos (AMAR-YULI *et al.*, 2007). A estrutura molecular e a polaridade determinam se o composto adicionado estará localizado na interface polar ou na região apolar da camada lipídica, o que afeta o fator de empacotamento (CABOI *et al.*, 2001). O aumento do parâmetro de rede pode ser devido à (i) hidratação da estrutura ou a presença de moléculas hidrofílicas nos domínios aquosos que resulta no seu alargamento e (ii) presença de moléculas anfífilas particionada entre o domínio polar e a cauda apolar (AMAR-YULI *et al.*, 2007; LIBSTER *et al.*, 2007; AMAR-YULI; ASERIN; GARTI, 2008), sugerindo que a molécula adicionada ao sistema está localizada internamente na estrutura líquido cristalina. Enquanto que, a sua redução sugere a desidratação dos domínios aquosos (AMAR-YULI *et al.*, 2007) e sua manutenção à presença de moléculas hidrofóbicas localizadas nas cadeias de hidrocarboneto da MO ou adsorção das moléculas na superfície das partículas reversas (LIBSTER *et al.*, 2007).

Analizando os valores do parâmetro de rede obtidos sem e com a incorporação de 10 μM de siRNA (**Tabela 5 e 6**), podemos observar que os valores obtidos para os géis de fase cúbica e hexagonal foram reduzidos após a incorporação de siRNA, com exceção do sistema de fase hexagonal MO/OAM 8,16:0,34.

A redução do parâmetro de rede dos géis de fase cúbica e fase hexagonal com a adição de siRNA pode ser explicada pela alta hidrofiliicidade do siRNA, que o faz competir com a MO pela água. Sugerindo-se que a capacidade do siRNA em se ligar com a água é maior do que a da MO, desta forma, ocorre a desidratação da MO, diminuindo o tamanho efetivo dos seus grupos polares, que promoverá o encolhimento do parâmetro de rede. Este efeito também foi observado por outros autores ao adicionar polímero com equilíbrio hidrofílico-lipofílico igual a 17 a sistemas líquido cristalinos obtidos a partir de MO (AMAR-YULI *et al.*, 2007).

A adição de PEI em baixas concentrações (0,065 e 0,131) promoveu aumento do parâmetro de rede da estrutura, possivelmente devido a sua localização nos domínios aquosos do cristal líquido. Esta constatação corrobora com o proposto anteriormente sobre o posicionamento do PEI na formação dos sistemas líquido cristalinos.

4.2.7. Avaliação do perfil de liberação do siRNA *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados em placa de 12 poços com insert e o siRNA foi determinado qualitativamente por eletroforese.

A **Figura 26** mostra o siRNA liberado das formulações sem a adição de polímero ou lipídeo catiônico e com PEI ou OAM.

Figura 26: Liberação do siRNA de diferentes formulações, nos tempos de 48 horas e 7, 14, 21 e 30 dias.

Observa-se que o siRNA em água DEPC é liberado nas primeiras 48 horas, o mesmo ocorre para o sistema de fase cúbica com MO na proporção de 7,85, que por não ter a presença de PEI ou OAM, não forma complexo com siRNA, facilitando a sua liberação. A formulação com MO na proporção de 15,69 teve uma pequena liberação de siRNA nas primeiras 48 horas, o que pode ser devido a um “efeito burst” antes da formação do gel (embora a formação de gel seja rápida como demonstrado nos estudos de cinética de intumescimento), ocorreu a liberação do siRNA em pequena quantidade, uma vez que não há o PEI ou a OAM para promover a sua complexação. Mesmo que este sistema não tenha formado complexo com o siRNA, como demonstrado nos estudos de eficiência de complexação, a liberação do siRNA ocorreu de maneira sustentada de 7 a 14 dias, o que pode ser devido a fase cúbica formada.

A fase cúbica tem sido descrita capaz de promover uma liberação sustentada de ativos. Para que ocorra a liberação de fármacos hidrofílicos a partir de sistemas de fase cúbica, os mesmos têm que se difundirem da estrutura interna da matriz para meio externo através dos canais de água. O tamanho dos poros, a tortuosidade dos canais de água, a rigidez e a alta viscosidade desta fase contribuem para a liberação sustentada (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

Como observado acima, os sistemas de fase cúbica com MO 7,85 e 15,69 apresentaram diferenças no perfil de liberação e, uma possível explicação para esta diferença pode ser encontrada pela avaliação da absorção de água, uma vez que o primeiro apresentou maior absorção de água. A literatura tem reportado que matrizes que absorvem mais água proporcionariam uma rápida difusão e, consequentemente, uma liberação mais rápida do que aquelas com menor absorção de água, fato este atribuído ao aumento dos canais disponíveis para a liberação do ativo com o aumento do conteúdo aquoso (RIZWAN *et al.*, 2009).

As formulações MO/PEI 7,85:0,65 e 15,69:1,31 que são sistemas de mistura de fase cúbica com hexagonal liberaram o siRNA nas primeiras 48 horas, enquanto que para os sistemas com MO/PEI 7,85:0,065 e 15,69:0,013 não observamos a liberação de siRNA no período de 30 dias, possivelmente devido ter ocorrido uma liberação muito lenta do siRNA que não permitiu a detecção por eletroforese. Esta diferença de liberação entre os sistemas com maiores e menores proporções de PEI também pode ser explicada pela absorção de água, já que aqueles com maiores proporções de PEI absorveram mais água do que os com menores proporções de

PEI (**Figura 22**), assim promoveram uma liberação mais rápida de siRNA. Nestes sistemas a banda de siRNA foi observada somente na presença de heparina (tratamento para descomplexação do siRNA), mostrando que o siRNA foi liberado complexado ao PEI. Este resultado é bastante promissor, uma vez que a liberação de siRNA complexado ao PEI pode facilitar a sua transfecção celular (GUNTHER *et al.*, 2011; BEYERLE *et al.*, 2011).

O sistema de fase hexagonal MO/OAM 8,16:0,34 liberou o siRNA nos primeiros 7 dias, o siRNA não foi liberado complexado a OAM, já que a amostra com e sem heparina apresentaram banda. A fase hexagonal também tem sido descrita como capaz de promover uma liberação sustentada de ativos e se mostrou adequada para a liberação de ácidos nucleicos (DRUMMOND; FONG, 2000). Também não observamos a liberação de siRNA da formulação MO/OAM 16,32:0,68, a ausência de banda pode ser devido a uma liberação lenta de siRNA, onde a concentração liberada não pode ser detectada pela eletroforese, outra possibilidade é não ter ocorrido liberação a partir destas formulações no tempo analisado. Estudos futuros de quantificação do siRNA liberado terão que ser feitos para definirmos o perfil de liberação *in vitro* destas formulações.

Desta forma, podemos observar que tanto a fase formada quanto as características físico-químicas dos componentes que formam esta fase e as suas interações com o siRNA influenciam no perfil de liberação.

4.2.8. Avaliação da formação de gel *in situ* em modelo animal

A avaliação da formação e permanência do gel no sítio de injeção foi feita pelo período de 30 dias após a administração das formulações precursoras subcutaneamente em camundongos BALB/c fêmeas.

A **Figura 27** mostra a formação do gel *in vivo* e sua localização subcutânea.

Figura 27: Formação do gel *in vivo*. (A) Formulação precursora injetada subcutaneamente. (B) Localização do gel formado *in vivo* em camundongo BALB/c. (C) Corte histológico da pele com gel após coloração em H&E.

Foram avaliadas as formulações precursoras com proporções de 15,69 e 7,85 de MO sem PEI ou OAM (controles) e as formulações MO/PEI 15,69:1,31, 15,69:0,131 e 7,85:0,065 e as MO/OAM 16,32:0,68 e 8,16:0,34. As formulações foram filtradas em membrana de 0,20 µm para esterilização, uma vez que todas as formulações são fluidas para permitir que sejam filtradas. Esta característica é muito importante para formulações de aplicação parenteral, principalmente quando são formuladas com compostos que não permitem a sua esterilização por outros métodos.

Os resultados demonstraram que 24 horas após a administração é possível observar a formação de gel *in vivo*. Não houve diferenças, observadas visualmente, na quantidade de gel formado para as formulações com maiores ou menores quantidade de MO. Também não verificou-se alteração na formação do gel *in vivo* devido a presença ou ausência do PEI e da OAM.

O gel formado pode ser degradado por lipólise promovida por diferentes tipos de esterases que estão presentes nos tecidos (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001). Os géis obtidos a partir destas formulações precursoras persistiram por pelo menos 14 dias e em 30 dias não se observou a presença gel, com exceção daqueles obtidos a partir das formulações MO/PEI 7,85:0,065 e 15,69:1,31 e MO/OAM 16,32:0,68 onde havia vestígios de gel.

Este tempo de permanência do gel subcutaneamente é bastante interessante já que o mesmo funciona como um gel de depósito, que pode proteger e controlar a

liberação do siRNA.

A formação do gel *in vivo* e sua permanência no tecido subcutâneo estão demonstrados na **Figura 28**.

Figura 28: Cinética de geleificação da formulação MO/OAM/PG/tampão Tris 16,32:0,68:68:15 (p/p/p/p) administrada por via subcutânea em camundongos BALB/c, 24, 48, 72 horas e 7, 14 e 30 dias após a administração. A formação do gel está indicada pelas setas.

4.2.9. Avaliação da toxicidade *in vivo* em modelo animal

O estudo da toxicidade foi conduzido avaliando-se a migração e a presença de células inflamatórias no sítio de injeção após a administração subcutânea de 50 μ L das formulações precursoras. A inflamação é uma resposta natural do organismo quando este é lesionado ou quando há presença de agentes exógenos (MAJNO, JORIS, 2004). Desta forma, é importante avaliar a intensidade com que o organismo reagirá à presença de gel na hipoderme.

A administração de salina e salina com siRNA (10 μ M) que foram utilizados

como controle não apresentaram nenhum processo inflamatório. A epiderme, a derme, a camada muscular e a hipoderme estavam dentro da normalidade sem a presença de células inflamatórias ou tecidos degenerados.

A análise histológica dos cortes de pele com gel e tecido adjacentes das formulações com 7,85 e 15,69 de MO injetadas subcutaneamente e avaliadas em 24, 48, 72 horas e 7, 14 e 30 dias estão demonstradas nas **Tabelas 7 e 8**, respectivamente. As formulações com MO nas proporções de 7,85 e 15,69 também foram utilizadas como o controle das formulações MO/OAM 8,16:0,34 e 16,32:0,68, respectivamente, uma vez que a proporção de MO é semelhante não justificando o uso de mais animais para o estudo de outros controles.

Tabela 7: Resultado da avaliação histológica dos cortes de pele com gel e tecidos adjacentes corados em H&E das formulações com MO 7,85.

MO 7,85		24 h	48 h	72 h	7 d	14 d	30 d
Epiderme		=	=	=	=	=	=
Derme		=	=	=	=	=	=
Hipoderme	Camada muscular	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	Polimorfonucleares	X	X	X	X		
	Mononucleares			X (M)	X	X (M)	
	Mastócitos		X				X
	Fibroblastos					X	X
	Fibras colágenas						X
	Presença de gel	X	X	X	X	X	
	Células em torno do gel	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	
MO/PEI 7,85:0,065		24 h	48 h	72 h	7 d	14 d	30 d
Epiderme		=	=	=	=	=	=
Derme		=	=	=	=	=	=
Hipoderme	Camada muscular	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	Polimorfonucleares	X	X	X			
	Mononucleares		X (M)	X (M)	X	X (M)	X
	Mastócitos						
	Fibroblastos					X	X
	Fibras colágenas					X	X
	Presença de gel	X	X	X	X	X	X
	Células em torno do gel	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+) (M)
MO/OAM 8,16:0,34		24 h	48 h	72 h	7 d	14 d	30 d
Epiderme		=	=	=	=	=	=
Derme		=	=	=	=	=	=
Hipoderme	Camada muscular	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	Polimorfonucleares	X	X	X	X		
	Mononucleares			X (M)	X (M)	X	X (M)
	Mastócitos		X				
	Fibroblastos					X	X
	Fibras colágenas					X	X
	Presença de gel	X	X	X	X	X	
	Células em torno do gel	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	

= (preservado a característica normal do tecido); (-) (tecido degenerados); (+) (tecido em

regeneração); X (presença na hipoderme); (E) (predomínio de eosinófilos); (N) (predomínio de neutrófilos); (M) (predomínio de macrófagos).

Tabela 8: Resultado da avaliação histológica dos cortes de pele com gel e tecidos adjacentes corados em H&E das formulações com MO 15,69.

MO 15,69		24 h	48 h	72 h	7 d	14 d	30 d
Epiderme		=	=	=	=	=	=
Derme		=	=	=	=	=	=
Hipoderme	Camada muscular	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	Polimorfonucleares	X (N)	X	X (E)	X	X	
	Mononucleares			X	X	X (M)	
	Mastócitos		X		X		
	Fibroblastos						X
	Fibras colágenas						X
	Presença de gel	X	X	X	X	X	
	Células em torno do gel	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
MO/PEI 15,69:0,131		24 h	48 h	72 h	7 d	14 d	30 d
Epiderme		=	=	=	=	=	=
Derme		=	=	=	=	=	=
Hipoderme	Camada muscular	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	Polimorfonucleares	X (N) (E)	X	X	X (E)		
	Mononucleares			X (M)	X	X (M)	
	Mastócitos	X					
	Fibroblastos						X
	Fibras colágenas						X
	Presença de gel	X	X	X	X	X	
	Células em torno do gel	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
MO/PEI 15,69:1,31		24 h	48 h	72 h	7 d	14 d	30 d
Epiderme		=	=	=	=	=	=
Derme		=	=	=	=	=	=
Hipoderme	Camada muscular	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Polimorfonucleares	X (E)	X	X	X (E)	X (E)	
	Mononucleares				X (M)	X (M)	X (M)
	Mastócitos						
	Fibroblastos						
	Fibras colágenas						
	Presença de gel	X	X	X	X	X	X
	Células em torno do gel	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MO/OAM 16,32:0,68		24 h	48 h	72 h	7 d	14 d	30 d
Epiderme		=	=	=	=	=	=
Derme		=	=	=	=	=	=
Hipoderme	Camada muscular	=	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	Polimorfonucleares	X (E)	X				
	Mononucleares			X	X	X	X
	Mastócitos						
	Fibroblastos					X	X
	Fibras colágenas					X	X
	Presença de gel	X	X	X	X	X	X
	Células em torno do gel	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)

= (preservado a característica normal do tecido); (-) (tecido degenerados); (+) (tecido em regeneração); X (presença na hipoderme); (E) (predomínio de eosinófilos); (N) (predomínio de neutrófilos); (M) (predomínio de macrófagos).

Na **Figura 29** estão imagens representativas dos cortes histológicos obtidos neste estudo de toxicidade.

Figura 29: Cortes histológicos da pele corados em H&E. (A) Células degeneradas em torno do gel, com infiltrado de polimorfonucleares - após 48 horas da administração da formulação precursora MO/PG/tampão Tris 7,85:76,5:15,65 (p/p/p). (B) Hipoderme com macrófagos (seta) - após 7 dias da administração da formulação precursora MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:1,31:68:15 (p/p/p/p). (C) Presença de eosinófilos (setas) no tecido em torno do gel - após 24 horas da administração da

formulação precursora MO/PEI/PG/tampão Tris 15,69:1,31:68:15 (p/p/p/p). (D) Fibras colágenas e fibroblastos - após 14 dias da administração da formulação precursora MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,065:76,5:15,585 (p/p/p/p). (E) Fibras musculares integras – após 24 horas da administração de salina com siRNA (10 μ M). (F) Fibras musculares degeneradas – após 48 horas da administração de MO/OAM/PG/tampão Tris 16,32:0,68:68:15 (p/p/p/p). Aumento 400x.

Como podemos observar analisando as **Tabelas 7 e 8**, a epiderme e a derme mantiveram suas características preservadas após a injeção de qualquer uma das formulações capazes de formar gel *in situ*, porém os tecidos mais próximos ao gel formado foram afetados e houve infiltração de células inflamatórias. A camada muscular entre a derme e a hipoderme foi degenerada já em 24 horas e as fibras musculares que persistiram começaram a se regenerar após 14 dias da injeção, com exceção para tecidos com géis formados a partir dos sistemas MO/PEI 15,69:0,131 e 15,69:1,31. As fibras musculares da pele com gel MO/PEI 15,69:0,131 se regeneraram em 30 dias, porém o mesmo não foi observado em proporções maiores de MO e PEI.

Nas primeiras 24 horas após a injeção das formulações e formação do gel, ocorreu predominantemente infiltrado de polimorfonucleares, após 7 dias observamos o predomínio de mononucleares como os macrófagos. Também observamos a presença de mastócitos em alguns tecidos. A partir de 14 dias observamos em todos os géis formados com menores proporções de MO (7,85 e 8,16) e naquele formado com MO/OAM 16,32:0,34, a presença de fibroblastos e fibras colágenas promovendo a reparação do tecido.

Os eventos observados estão de acordo com um processo inflamatório normal: os polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos são as primeiras células a aparecerem na defesa do organismo contra agentes estranhos (MAJNO; JORIS, 2004) e tem a função de promover a limpeza da área, depois são fagocitados por macrófagos (SINGER; CLARK, 1999), os monócitos chegam ao sítio de inflamação num estágio mais tardio e são atraídos por quimiotaxia e no tecido são transformados em macrófagos (RANG; DALE; RITTER, 2001; OVALLE; NAHIRNEY, 2008). Os macrófagos fornecem uma fonte contínua de fatores de crescimento necessários para estimular a fibroplasia e angiogênese; os fibroblastos produzem fibras do tecido conjuntivo (incluindo as colágenas) necessárias para suportar o crescimento interno de células, e os vasos sanguíneos transportam oxigênio e nutrientes necessários para sustentar o metabolismo celular (SINGER; CLARK, 1999).

Vale ressaltar que a camada de células em torno do gel estava degenerada com infiltrado de células inflamatórias pelo período de 14 dias, em 30 dias o gel já havia sido reabsorvido na maioria dos animais e o tecido regenerado, com exceção dos grupos de MO/PEI 7,85:0,065 e 15,69:1,31 e MO/OAM 16,32:0,68, onde havia ainda vestígios de gel invadidos por muitos macrófagos, que são responsáveis pela ingestão de restos teciduais e células mortas (RANG; DALE; RITTER, 2001).

A análise histológica nos permite concluir que os géis formados com menores proporções de MO (7,85 e 8,16) provocaram uma inflamação menos intensa do que aqueles com maiores proporções (15,69 e 16,32). Isto pode ser evidenciado na **Figura 30** pela intensidade da presença de células inflamatórias em torno do gel.

Figura 30: Corte histológico da pele com gel após coloração em H&E. (A) Gel formado a partir da formulação MO/OAM 8,16:0,34, 48 horas após a injeção. (B) Gel formado a partir da formulação MO/OAM 16,32:0,68, 48 horas após a injeção.

Desta forma, o processo inflamatório parece ser proporcional a proporção de MO na formulação precursora, mas não podemos dizer que a capacidade de promover inflamação da MO se deve a sua capacidade de absorver água, pois de acordo com a cinética de absorção de água o sistema MO/PG/tampão Tris 15,69:68:16,31 que apresentou processo inflamatório intenso foi o que menos absorveu água.

Também podemos observar que concentrações maiores do polímero catiônico PEI, promoveram um processo inflamatório mais intenso. Isto é devido à citotoxicidade do PEI já relatada na literatura (LIU *et al.*, 2011). No presente estudo, a OAM mostrou-se menos tóxica do que o PEI. Embora na literatura os lipídeos

catiônicos também tenham sido relatados como citotóxicos, esta toxicidade, porém, é mais pronunciada em lipídeos catiônicos multivalentes do que em monovalentes, como é o caso da OAM (OZPOLAT; SOOD; LOPEZ-BERESTEIN, 2010).

Assim, embora tenha ocorrido um processo inflamatório, os sistemas se mostraram adequados para aplicação *in vivo*, principalmente aqueles com menores proporções de MO, uma vez que o tecido conseguiu se regenerar e não provocou nenhuma reação inflamatória muito intensa.

5. CONCLUSÃO

A discussão dos resultados obtidos permitiu concluir que:

- ❖ Adequada associação de MO, PG, tampão Tris e PEI ou OAM leva à formação de fases líquido cristalinas interessantes para serem usadas como sistemas de liberação de fármacos para administração subcutânea, uma vez que são inicialmente menos viscosos e ao entrarem em contato com excesso de água formam géis de fase líquido cristalinas.
- ❖ As análises por microscopia de luz polarizada e difração de raios X comprovaram que os géis obtidos com excesso de água, são géis de fase cúbica quando não há a incorporação de polímero ou lipídeo catiônico. Quando há incorporação de OAM os géis obtidos são de fase hexagonal. Com a incorporação de PEI em menores concentrações os géis obtidos são de fase cúbica enquanto que uma maior concentração de PEI favorece a obtenção de gel de fase hexagonal.
- ❖ Os estudos de eficiência de complexação mostraram que o PEI é eficiente para complexar com o siRNA mesmo em baixas concentrações e a carga residual positiva do sistema é interessante para a liberação de ácidos nucleicos. Já a OAM apresenta eficiência de complexação dependente da sua concentração.
- ❖ O estudo de absorção de água indicou que a formação de fase líquido cristalina é um processo rápido, tornando este sistema ainda mais atrativo.
- ❖ O estudo de estabilidade do siRNA complexado a formulação mostrou que o siRNA permanece íntegro no complexo.
- ❖ Os estudos de liberação *in vitro* mostraram que as formulações com maior capacidade de absorção de água liberaram o siRNA mais rapidamente, para as outras formulações o estudo realizado não permitiu a definição do perfil de liberação do siRNA, sendo necessário estudos posteriores. Além disto, observou-se que o siRNA é liberado complexado ao polímero PEI, o que poderá favorecer os processos de transfecção celular.
- ❖ Os estudos de formação de gel *in vivo* em modelo animal mostraram que o gel é formado subcutaneamente após a injeção da formulação precursora e é degradado em 30 dias.
- ❖ Os estudos de toxicidade revelaram que a proporção de MO no sistema é o fator que mais influencia na promoção do processo inflamatório. E os sistemas desenvolvidos com menos MO apresentaram um processo inflamatório moderado, sendo aceitável para a administração *in vivo*.

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que as formulações precursoras de fase líquido cristalinas MO/OAM/PG/tampão Tris 8,16:0,34:76,5:15 (p/p/p/p) e MO/PEI/PG/tampão Tris 7,85:0,065:76,5:15,585 (p/p/p/p) são sistemas de liberação promissores para a aplicação subcutânea de siRNA para o tratamento de patologias onde a administração localizada e sustentada são uma vantagem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD, L. e ROSSI, J. J. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 59, n. 2-3, p. 75-86, 2007.

AMAR-YULI, I.; ASERIN, A. e GARTI, N. Solubilization of nutraceuticals into reverse hexagonal mesophases. **J.Phys.Chem.B** v. 112, n. 33, p. 10171-10180, 2008.

AMAR-YULI, I. e GARTI, N. Transitions induced by solubilized fat into reverse hexagonal mesophases. **Colloids Surf.B Biointerfaces**. v. 43, n. 2, p. 72-82, 2005.

AMAR-YULI, I.; WACHTEL, E.; SHOSHAN, E. B.; DANINO, D.; ASERIN, A. e GARTI, N. Hexosome and hexagonal phases mediated by hydration and polymeric stabilizer. **Langmuir** v. 23, n. 7, p. 3637-3645, 2007.

BEYERLE, A.; BRAUN, A.; MERKEL, O.; KOCH, F.; KISSEL, T. e STOEGER, T. Comparative in vivo study of poly(ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice. **J.Control Release** v. 151, p. 51-56, 2011.

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

BUMCROT, D.; MANOHARAN, M.; KOTELIANSKY, V. e SAH, D. W. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. **Nat.Chem.Biol.** v. 2, n. 12, p. 711-719, 2006.

BUYENS, K.; LUCAS, B.; RAEMDONCK, K.; BRAECKMANS, K.; VERCAMMEN, J.; HENDRIX, J.; ENGELBORGH, Y.; DE SMEDT, S. C. e SANDERS, N. N. A fast and sensitive method for measuring the integrity of siRNA-carrier complexes in full human serum. **J.Control Release** v. 126, n. 1, p. 67-76, 2008.

CABOI, F.; AMICO, G. S.; PITZALIS, P.; MONDUZZI, M.; NYLANDER, T. e LARSSON, K. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein/water system. I. Phase behavior. **Chem.Phys.Lipids** v. 109, n. 1, p. 47-62, 2001.

CHANG, C. M. e BODMEIER, R. Binding of drugs to monoglyceride-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics** v. 147, n. 2, p. 135-142, 1997a.

CHANG, C. M. e BODMEIER, R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. **J.Pharm.Sci.** v. 86, n. 6, p. 747-752, 1997b.

CHANG, C. M. e BODMEIER, R. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. **International Journal of Pharmaceutics** v. 173, n. 1-2, p. 51-60, 1998.

CLINICAL TRIALS.GOV. Clinical trials with siRNA. Disponível em <<http://www.clinicaltrials.gov>>. Acesso em junho, 2012.

DAVID, S.; PITARD, B.; BENOIT, J. P. e PASSIRANI, C. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. **Pharmacological Research** v. 62, n. 2, p. 100-114, 2010.

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

DE FOUGEROLLES, A. R. Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. **Hum.Gene Ther.** v. 19, n. 2, p. 125-132, 2008.

DE PAULA, D.; BENTLEY, M. V. e MAHATO, R. I. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. **RNA.** v. 13, n. 4, p. 431-456, 2007.

DE, M. H.; VAUTHIER, C.; MALVY, C. e COUVREUR, P. Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: oligonucleotides and siRNA. **Eur.J.Pharm.Biopharm.** v. 71, n. 3, p. 490-504, 2009.

DONG, Y. D. e BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **Int.J.Pharm.** v. 417, n. 1-2, p. 101-111, 30 2011.

DRUMMOND, C. J. e FONG, C. Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. **Curr Opinion Colloid Interf Sci.** v. 4, p.449-456, 2000.

DYKXHOORN, D. M.; PALLISER, D. e LIEBERMAN, J. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. **Gene Ther.** v. 13, n. 6, p. 541-552, 2006.

ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K. e TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature** v. 411, n. 6836, p. 494-498, 2001.

ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W. e TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes Dev.** v. 15, n. 2, p. 188-200, 2001.

FERREIRA, D. A. **Sistemas carreadores a base de monoleína para veiculação de DNA e proteína na vacinação da Tuberculose.** 2005. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E. e MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FONG, W. K.; HANLEY, T. e BOYD, B. J. Stimuli responsive liquid crystals provide 'on-demand' drug delivery in vitro and in vivo. **J.Control Release** v. 135, n. 3, p. 218-226, 2009.

GERAGHTY, P. B.; ATTWOOD, D.; COLLETT, J. H. e DANDIKER, Y. The in vitro release of some antimuscarinic drugs from monoolein/water lyotropic liquid crystalline gels. **Pharm.Res.** v. 13, n. 8, p. 1265-1271, 1996.

GHOSN, B.; SINGH, A.; LI, M.; VLASSOV, A. V.; BURNETT, C.; PURI, N. e ROY, K. Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nanocarrier for small interfering RNA. **Oligonucleotides** v. 20, n. 3, p. 163-172, 2010.

GUNTHER, M.; LIPKA, J.; MALEK, A.; GUTSCH, D.; KREYLING, W. e AIGNER, A. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. **Eur.J.Pharm.Biopharm.** v. 77, p.438-449, 2011.

HAN, H. D.; MORA, E. M.; ROH, J. W.; NISHIMURA, M.; LEE, S. J.; STONE, R. L.; BAR-ELI, M.; LOPEZ-BERESTEIN, G. e SOOD, A. K. Chitosan hydrogel for localized gene silencing. **Cancer Biol.Ther.** v. 11, n. 9, p. 839-845, 2011.

HATEFI, A. e AMSDEN, B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. **J.Control Release** v. 80, n. 1-3, p. 9-28, 2002.

HELLEDI, L. S. e SCHUBERT, L. Release kinetics of acyclovir from a suspension of acyclovir incorporated in a cubic phase delivery system. **Drug Dev.Ind.Pharm.** v. 27, n. 10, p. 1073-1081, 2001.

JACKSON, A. L. e LINSLEY, P. S. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. **Nat.Rev.Drug Discov.** v. 9, n. 1, p. 57-67, 2010.

KARAGIANNIS, T. C. e EL OSTA, A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. **Cancer Gene Therapy** v. 12, n. 10, p. 787-795, 2005.

KOLTOVER, I.; SALDITT, T.; RADLER, J. O. e SAFINYA, C. R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. **Science** v. 281, n. 5373, p. 78-81, 1998.

KREBS, M. D. e ALSBERG, E. Localized, Targeted, and Sustained siRNA Delivery. **Chemistry.** v. 17, p. 3054-3062, 2011.

KULKARNI, C. V.; WACHTER, W.; IGLESIAS-SALTO, G.; ENGELSKIRCHEN, S. e AHUALLI, S. Monoolein: a magic lipid? **Phys.Chem.Chem.Phys.** v. 13, n. 8, p. 3004-3021, 2011.

KUTSUMIZU, S. The thermotropic cubic phase: a curious mesophase. **Curr.Opin.Solid ST M.** v. 6., p.537-543, 2002.

LARA, M. G.; BENTLEY, M. V. e COLLETT, J. H. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. **Int.J.Pharm.** v. 293, n. 1-2, p. 241-250, 2005.

LARSON, S. D.; JACKSON, L. N.; CHEN, L. A.; RYCHAHOU, P. G. e EVERS, B. M. Effectiveness of siRNA uptake in target tissues by various delivery methods. **Surgery** v. 142, n. 2, p. 262-269, 2007.

LEE, J.; CHOI, S. U.; YOON, M. K. e CHOI, Y. W. Kinetic characterization of swelling of liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **Arch.Pharm.Res.** v. 26, n. 10, p. 880-885, 2003.

LEE, S. H.; CHOI, S. H.; KIM, S. H. e PARK, T. G. Thermally sensitive cationic polymer nanocapsules for specific cytosolic delivery and efficient gene silencing of

siRNA: swelling induced physical disruption of endosome by cold shock. **J.Control Release** v. 125, n. 1, p. 25-32, 2008.

LENZ, G. The RNA interference revolution. **Braz J Med Biol Res** v. 38, p. 1749-1757, 2005.

LIBSTER, D.; ASERIN, A. e GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: drug delivery and crystallization applications. **J.Colloid Interface Sci.** v. 356, n. 2, p. 375-386, 2011.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; WACHTEL, E.; SHOHAM, G. e GARTI, N. An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporin A: physical characterization. **J.Colloid Interface Sci.** v. 308, n. 2, p. 514-524, 2007.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; YARIV, D.; SHOHAM, G. e GARTI, N. Concentration- and temperature-induced effects of incorporated desmopressin on the properties of reverse hexagonal mesophase. **J.Phys.Chem.B** v. 113, n. 18, p. 6336-6346, 2009.

LINDBLOM, G. e RILFORS, L. Cubic phase and isotropic structures formed by membrane lipids-possible biological relevance. **Biochim.Biophys.Acta** v. 988, p. 221-256, 1989.

LIU, Z.; ZHENG, M.; MENG, F. e ZHONG, Z. Non-viral gene transfection in vitro using endosomal pH-sensitive reversibly hydrophobilized polyethylenimine. **Biomaterials** v. 32, n. 34, p. 9109-9119, 2011.

LOPES, L. B.; FERREIRA, D. A.; DE PAULA, D.; GARCIA, M. T.; THOMAZINI, J. A.; FANTINI, M. C. e BENTLEY, M. V. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: in vitro and in vivo skin penetration of cyclosporin A. **Pharm.Res.** v. 23, n. 6, p. 1332-1342, 2006a.

LOPES, L. B.; LOPES, J. L.; OLIVEIRA, D. C.; THOMAZINI, J. A.; GARCIA, M. T.; FANTINI, M. C.; COLLETT, J. H. e BENTLEY, M. V. Liquid crystalline phases of 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, n. 2, p. 146-155, 2006b.

LU, J. J.; LANGER, R. e CHEN, J. A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. **Mol.Pharm.** v. 6, n. 3, p. 763-771, 2009.

MAJNO, G. e JORIS, I. **Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology**. 2nd Edition. Oxford University Press, 2004.

MARTINI, E.; FATTAL, E.; DE OLIVEIRA, M. C. e TEIXEIRA, H. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. **Int.J.Pharm.** v. 352, n. 1-2, p. 280-286, 2008.

MASIERO, M.; NARDO, G.; INDRACCOLO, S. e FAVARO, E. RNA interference: implications for cancer treatment. **Mol.Aspects Med.** v. 28, n. 1, p. 143-166, 2007.

MATSCHKE, C.; ISELE, U.; VAN HOOGEVEST, P. e FAHR, A. Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. **J.Control Release** v. 85, n. 1-3, p. 1-15, 2002.

MEZZENGA, R.; GRIGOROV, M.; ZHANG, Z. D.; SERVAIS, C.; SAGALOWICZ, L.; ROMOSCANU, A. I.; KHANNA, V. e MEYER, C. Polysaccharide-induced order-to-order transitions in lyotropic liquid crystals. **Langmuir** v. 21, n. 14, p. 6165-6169, 2005.

MITCHELL, D. J. e NINHAM, B. W. Micelles, Vesicles and Micro-Emulsions. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II** v. 77, p. 601-629, 1981.

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

OVALLE, W. K. e NAHIRNEY, P. C. Tecido conjuntivo propriamente dito. In:_____.**Netter, Bases da Histologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 3, p. 51-69.

OZPOLAT, B.; SOOD, A. K. e LOPEZ-BERESTEIN, G. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. **J.Intern.Med.** v. 267, n. 1, p. 44-53, 2010.

PACKHAEUSER, C. B. e KISSEL, T. On the design of in situ forming biodegradable parenteral depot systems based on insulin loaded dialkylaminoalkyl-amine-poly(vinyl alcohol)-g-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. **J.Control Release** v. 123, n. 2, p. 131-140, 2007.

PARK, J. S.; OH, Y. K.; KANG, M. J. e KIM, C. K. Enhanced mucosal and systemic immune responses following intravaginal immunization with human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine in thermosensitive mucoadhesive delivery systems. **J.Med.Virol.** v. 70, n. 4, p. 633-641, 2003.

PARK, J. S.; OH, Y. K.; YOON, H.; KIM, J. M. e KIM, C. K. In situ gelling and mucoadhesive polymer vehicles for controlled intranasal delivery of plasmid DNA. **J.Biomed.Mater.Res.** v. 59, n. 1, p. 144-151, 2002.

PHAN, S.; FONG, W. K.; KIRBY, N.; HANLEY, T. e BOYD, B. J. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. **Int.J.Pharm.** v. 421, n. 1, p. 176-182, 2011.

PHELPS, J.; BENTLEY, M. V. e LOPES, L. B. In situ gelling hexagonal phases for sustained release of an anti-addiction drug. **Colloids Surf.B Biointerfaces**. v. 87, n. 2, p. 391-398, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M. e RITTER, J. M. Hormônios locais, inflamação e alergia. In:_____. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001. cap. 12, p. 164-188.

REISCHL, D. e ZIMMER, A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. **Nanomedicine**. v. 5, n. 1, p. 8-20, 2009.

RIZWAN, S. B.; HANLEY, T.; BOYD, B. J.; RADES, T. e HOOK, S. Liquid crystalline systems of phytantriol and glyceryl monooleate containing a hydrophilic protein: Characterisation, swelling and release kinetics. **J.Pharm.Sci**. v. 98, n. 11, p. 4191-4204, 2009.

SADHALE, Y. e SHAH, J. C. Biological activity os insulin in GMO gels and the effect of agitation. **Int.J.Pharm**. v. 191., p.65-74, 1999.

SCHROEDER, A.; LEVINS, C. G.; CORTEZ, C.; LANGER, R. e ANDERSON, D. G. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. **J.Intern.Med**. v. 267, n. 1, p. 9-21, 2010.

SHAH, J. C.; SADHALE, Y. e CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Adv.Drug Deliv.Rev**. v. 47, n. 2-3, p. 229-250, 2001.

SHARMA, G.; ITALIA, J. L.; SONAJE, K.; TIKOO, K. e RAVI KUMAR, M. N. Biodegradable in situ gelling system for subcutaneous administration of ellagic acid and ellagic acid loaded nanoparticles: evaluation of their antioxidant potential against cyclosporine induced nephrotoxicity in rats. **J.Control Release** v. 118, n. 1, p. 27-37, 2007.

SHEN, Y.; WANG, B.; LU, Y.; OUAHAB, A.; LI, Q. e 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, n. 1-2, p. 233-243, 2011.

SIFUENTES-ROMERO; ITZEL; MILTON, S. L.; GARCI'A-GASCA e ALEJANDRA. Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: Where do we stand? **Mutation Research** v. 728, n. 3, p. 158-171, 2011.

SINGER, A. J. e CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N.Engl.J.Med**. v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

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

SUN, B. K. e TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **J.Am.Acad.Dermatol**. v. 59, n. 5, p. 725-737, 2008.

TARATULA, O.; GARBUZENKO, O. B.; KIRKPATRICK, P.; PANDYA, I.; SAVLA, R.; POZHAROV, V. P.; HE, H. e MINKO, T. Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery. **J.Control Release** v. 140, n. 3, p. 284-293, 2009.

TRAN, M. A.; GOWDA, R.; SHARMA, A.; PARK, E. J.; ADAIR, J.; KESTER, M.; SMITH, N. B. e ROBERTSON, G. P. Targeting B-V600E-Raf and AW using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. **Cancer Research** v. 68, n. 18, p. 7638-7649, 2008.

VARKOUHI, A. K.; LAMMERS, T.; SCHIFFELERS, R. M.; VAN STEENBERGEN, M. J.; HENNINK, W. E. e STORM, G. Gene silencing activity of siRNA polyplexes based on biodegradable polymers. **Eur.J.Pharm.Biopharm.** v. 77, p. 450-457, 2011.

WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R. e ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nat.Rev.Drug Discov.** v. 8, n. 2, p. 129-138, 2009.

ANEXO

Anexo 1 – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1749.53.8), intitulado "Sistemas de Liberação de Geleificação *in situ* para Veiculação de siRNA: desenvolvimento, caracterização e estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal", de autoria de **Livia Neves Borgheti Cardoso**, 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 06/04/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.1749.53.8), entitled: "Sistemas de Liberação de Geleificação *in situ* para Veiculação de siRNA: desenvolvimento, caracterização e estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal", by **Livia Neves Borgheti Cardoso** 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, April 06, 2011.

Ribeirão Preto, 9 de abril de 2011.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro