UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Sistemas líquido cristalinos de geleificação *in situ* de administração intratumoral para liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele

Livia Neves Borgheti Cardoso

Ribeirão Preto
2016

RESUMO

BORGHETI-CARDOSO, L.N. **Sistemas líquido cristalinos de geleificação *in situ* de administração intratumoral para liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele.** 2016. 121f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O mecanismo de interferência por RNA (RNAi) é um evento de silenciamento gênico através da degradação do RNA mensageiro. Desta forma, a administração de siRNA (molécula efetora do RNAi) é uma terapia promissora para o tratamento de diversas doenças como o câncer. Porém, para a sua efetiva aplicação terapêutica é necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação capazes de liberar o siRNA nas células alvo, promover a sua internalização celular e evitar a sua degradação. Dentre os sistemas de liberação, os de liberação localizada, como os sistemas de geleificação *in situ,* apresentam vantagens sobre administração sistêmica. Formulações fluidas precursoras (FFP) que formam sistemas líquido cristalinos viscosos *in situ* podem ser obtidas a partir de lipídeos anfifílicos que absorvem água do meio e se rearranjam. Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o gel formado *in situ* a partir da FFP (G-FFP), composta por monoglicerídeos (MO), polietilenoimina (PEI), propilenoglicol (PG) e tampão tris, como sistema de liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele. Os resultados mostraram que o G-FFP é uma mistura de fase cúbica e fase hexagonal. O G-FFP liberou o siRNA de maneira sustentada e complexado ao PEI. A FFP pode ser esterilizada por filtração em membrana e foi capaz de complexar altas concentrações de siRNA (15 mM) e de proteger o siRNA da degradação. A citotoxicidade foi dependente da concentração de FFP e esta quando complexada com siRNA teve a toxicidade diminuída. O siRNA liberado do G-FFP foi internalizado pelas células A431, FaDu, HeLa, A549, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP. Além disto, siRNAs específicos liberados pelo G-FFP foram capazes de reduzir a expressão da proteína Firefly luciferase em células HeLa e FaDu, pórem não foram capazes de reduzir a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) nas células A431, HeLa, A549 e FaDu. A redução da expressão de EGFR em células A549 foi observado quando a terapia com siRNA foi combinada com internalização fotoquímica. Destes resultados, pode-se inferir que a transfecção celular do siRNA e o silenciamento gênico promovido por ele foi dependente tanto do tipo de linhagem celular como do alvo desejado. Os estudos *in vivo* mostraram que ocorre a formação de gel intratumoral e após 3 dias da administração intratumoral da FFP contendo siRNA específico para EGFR houve redução de 30% no tamanho dos tumores comparados aos tumores tratados com FFP sem siRNA. Diante destes resultados, pode-se concluir que o sistema desenvolvido tem potencial como sistema de liberação localizada de siRNA quando aplicado subcutaneamente ou intratumoral, uma vez que complexa o siRNA, promove a sua internalização celular e o siRNA liberado no citoplasma das células pode reduzir a expressão de proteínas de interesse.

Palavras-chave: sistema de liberação líquido cristalino, gel *in situ*, siRNA, câncer de pele e EGFR

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia Gênica - Interferência por RNA (RNAi)

1.1.1. Terapia Gênica

A terapia gênica tem o potencial de alterar profundamente a maneira de abordar e tratar doenças crônicas e adquiridas porque permite regular, reparar, substituir, adicionar, deletar ou silenciar uma sequência gênica que é identificada como benéfica ou prejudicial ao funcionamento adequado do organismo (NABEL, 2004; WIRTH; PARKER; YLA-HERTTUALA, 2013). Mais de 1800 testes clínicos de terapia gênica aprovados foram ou estão sendo conduzidos (WIRTH; PARKER; YLA-HERTTUALA, 2013). Embora os desafios e riscos associados a esta terapia sejam maiores do que o previsto inicialmente, todo o conhecimento adquirido com estes estudos permitiu a proposição de terapias mais efetivas, dentre elas as que envolvem o silenciamento de genes têm atraído a atenção de muitos pesquisadores e pode ser alcançada por diferentes processos (NABEL, 2004).

O silenciamento de genes pode ser realizado no nível transcricional ou pós-transcricional. O silenciamento gênico transcricional é baseado na manipulação de sequências gênicas pela inserção de mutações em regiões específicas do gene, produzindo proteínas truncadas ou proteínas com domínios não funcionais. Já no silenciamento gênico pós-transcricional a repressão da expressão gênica é feita pela degradação do RNA mensageiro (RNAm) (CAPECCHI, 1989; SCHERER; ROSSI, 2003; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011).

O processo de silenciamento gênico pós-transcricional foi descrito pela primeira vez pelos grupos de Richard Jorgensen and Joseph Mol enquanto eles tentavam aumentar a expressão de genes em petúnias. Eles introduziram múltiplas cópias do gene envolvido na produção da pigmentação e, surpreendentemente, houve silenciamento tanto do gene exógeno quanto do gene endógeno, o que resultou em flores totalmente brancas ou irregularmente coloridas. A este processo foi dado o nome de co-supressão porque o gene endógeno e o exógeno promoveram o silenciamento um do outro (JORGENSEN et al., 1996; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011; VAN DER KROL et al., 1990). Ao mesmo tempo, Guo e Kemphues, ao investigar a função de genes no nemátodo *Caenorhabditis elegans,* administraram RNA antisense para bloquear a produção da proteína de interesse, obtendo o resultado esperado. Porém, eles observaram o mesmo efeito quando a fita sense do RNA foi injetada como controle negativo (GUO; KEMPHUES, 1995). Enquanto isto, o grupo de Andrew Fire and Craig Mello obtiveram resultados

similares aos de Guo e Kemphues ao injetar a fita sense e antisense separadamente no nemátodo. Mas, eles injetaram também a fita sense e antisense juntas e descobriram que a dupla-fita de RNA (dsRNA) foi muito mais efetiva em produzir a interferência do que cada fita isolada. Este processo foi denominado interferência por RNA (RNAi) (FIRE et al., 1998).

1.1.2. Interferência por RNA (RNAi)

RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional e desde a sua descoberta tem revolucionado as pesquisas das áreas das ciências biológicas e biomédicas (DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007).

O mecanismo de RNAi (Figura 1) pode ser didaticamente dividido em duas fases: a fase de iniciação e a fase de execução. A fase de iniciação consiste na geração ou introdução de moléculas efetoras (*small interfering* (siRNA) e microRNA (miRNA)) no citoplasma das células. O siRNA é gerado no citoplasma pela clivagem de dsRNA pela enzima Dicer em pequenos nucleotídeos de aproximadamente 21-23 bases. A geração do miRNA 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 complexos proteicos denominados RISC (RNA *Induced Silencing Complex)*. Uma helicase presente neste complexo abre a dupla-fita do siRNA, a fita antisense é usada como guia para reconhecer o RNAm alvo, que é clivado pelo complexo, degradando-o (DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007; ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001; VICENTINI et al., 2013b; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009). 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).

Desde a identificação do mecanismo de RNAi, siRNA tem sido muito usado como ferramenta na pesquisa da função de genes (ELBASHIR et al., 2002), identificação de potenciais genes causadores de doenças (CAMPOCHIARO, 2006) e como uma promissora abordagem no tratamento de doenças (DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007; MASIERO et al., 2007; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009), isto porque em princípio qualquer alvo pode ser inibido, o siRNA é especifico,

facilmente sintetizado e será sempre uma molécula com as mesmas características físico-químicas (BUMCROT et al., 2006; DAKA; PEER, 2012; XU; WANG, 2015).

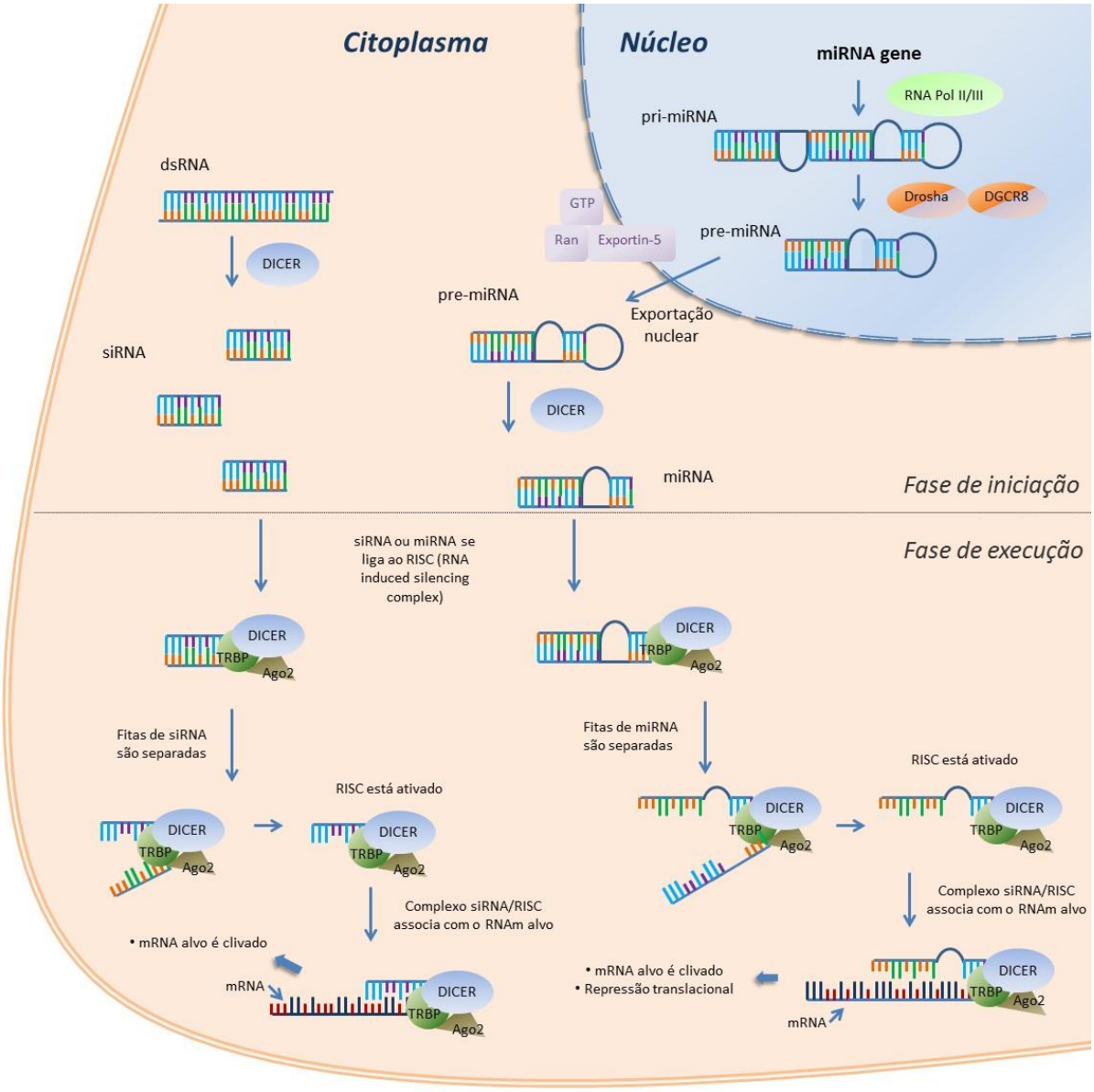

Figura 1. Mecanismo de interferência por RNA. Adaptado com autorização de (VICENTINI et al., 2013b). Copyright (2013) Springer.

RNAi tem mostrado potencial para tratar diversas doenças incluindo desordens da pele (JACOBSON et al., 2010; VICENTINI et al., 2013a), aterosclerose (LI et al., 2010), câncer (ABBASI et al., 2011; ARIMA et al., 2012; HSU et al., 2013; TARATULA et al., 2011) e infecções virais (ALVAREZ et al., 2009; BITKO et al., 2005; DEVINCENZO et al., 2008, 2010; LI et al., 2005; ZAMORA et al., 2011). Também tem mostrado potencial para regeneração de tecidos (MITTNACHT et al., 2010; NELSON et al., 2012; RUJITANAROJ et al., 2013). O RNAi apresenta várias vantagens sobre a

terapia convencional com fármacos, que envolve o uso de pequenas moléculas ou proteínas, e sobre a terapia gênica baseada em DNA. A principal vantagem do RNAi sobre a terapia convencional é que em princípio qualquer alvo pode ser inibido. RNAi pode silenciar proteínas que não são facilmente bloqueadas por fármacos convencionais por apresentarem conformações não acessíveis a estes fármacos. Além disto, o siRNA é especifico e consegue bloquear a expressão somente da proteína de interesse, já com o fármaco convencional, devido a similaridade estrutural entre algumas proteínas, o bloqueio não-específico pode acontecer. Outra vantagem do RNAi sobre fármacos convencionais é que a inibição da expressão gênica pode ser mais efetiva para o alcance do resultado terapêutico do que o bloqueio da proteína alvo, isto porque uma molécula de RNAm é traduzida em várias cópias de proteína e um siRNA pode silenciar múltiplas cópias de RNAm (BUMCROT et al., 2006; DAKA; PEER, 2012). O siRNA também tem a vantagem de ser uma molécula com aproximadamente as mesmas características físico-químicas e sua produção sintética ser relativamente fácil (BUMCROT et al., 2006). Possuir as mesmas características fisico-químicas é vantajoso pois facilita o desenvolvimento de formulação farmacêutica para a sua aplicação clínica, permitindo que, independentemente da sequência de siRNA usada, os mesmos requisitos para uma formulação ideal seja necessário. Porém, estas mesma características fisico-químicas são os principais desafios para a sua aplicação terapêutica, já que o siRNA precisa alcançar o citoplasma das células para ter ação. Embora isto seja um importante obstáculo a ser superado, é menos desafiador do que as terapias baseadas em DNA, que são moléculas maiores e precisam alcançar o núcleo (DAVID et al., 2010).

Embora os benefícios para usar RNAi na terapia são obvios, poucos siRNAs têm sido avaliados para aplicação clínica (ZHOU et al., 2013). Desde a descoberta do RNAi, houve pouco mais de 50 ensaios clínicos envolvendo 26 siRNAs diferentes (OZCAN et al., 2015). Os estudos clínicos iniciais foram feitos para o tratamento de doenças nas quais a administração localizada de siRNA era desejada como, por exemplo, degeneração macular, edema macular diabético, glaucoma e infecção pelo vírus sincicial respiratório. Na maioria destes estudos os siRNAs foram injetados ou aplicados topicamente na sua forma *naked*. No entanto, estes ensaios clínicos decepcionaram as elevadas expectativas da comunidade científica e médica. Problemas de segurança em relação ao siRNA (por exemplo, terapias baseadas em siRNA *naked* desencadearam respostas imunológicas) e baixa eficácia no tratamento

foram relatados, o que levou a finalização de muitos estudos antecipadamente (OZCAN et al., 2015; SARETT; NELSON; DUVALL, 2015). Os estudos clínicos envolvendo administração sistêmica de siRNA tiveram como orgão alvo principalmente o fígado. Esta abordagem é motivada pela habilidade de explorar a função fisiológica do fígado como sistema de depuração e filtração. Usando esta estratégia, muitos siRNAs se mostraram eficazes em testes pre-clínicos e clínicos para silenciar genes hepáticos relevantes. Porém, a administração sistêmica de siRNA para outros tecidos além do fígado tem sido mais desafiador (SARETT; NELSON; DUVALL, 2015). Dos 12 testes clínicos administrando siRNA por injeção intravenosa que foram ou estão sendo realizados, 11 deles usaram ou usam sistemas de liberação (OZCAN et al., 2015). Estes estudos clínicos nos mostram que é fundamental desenvolver sistemas de liberação para administração localizada ou sistêmica de siRNA de forma segura e eficaz.

1.2. Sistemas de Liberação

1.2.1. Sistemas de liberação para administração de siRNA

A aplicação terapêutica do siRNA é um desafio, devido as suas características físico-químicas como apresentar carga negativa e ter alto peso molecular (~ 13 kDa). Os principais desafios para a aplicação clínica do siRNA são a instabilidade do siRNA no corpo, a ineficiente internalização celular e – até quando a internalização celular ocorre -, o difícil escape endossomal (Figura 2) (SCHROEDER et al., 2010; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009). Portanto, é necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação para que estes desafios sejam superados e o siRNA seja liberado no citoplasma, incorporado ao RISC e ocorra o silenciamento gênico.

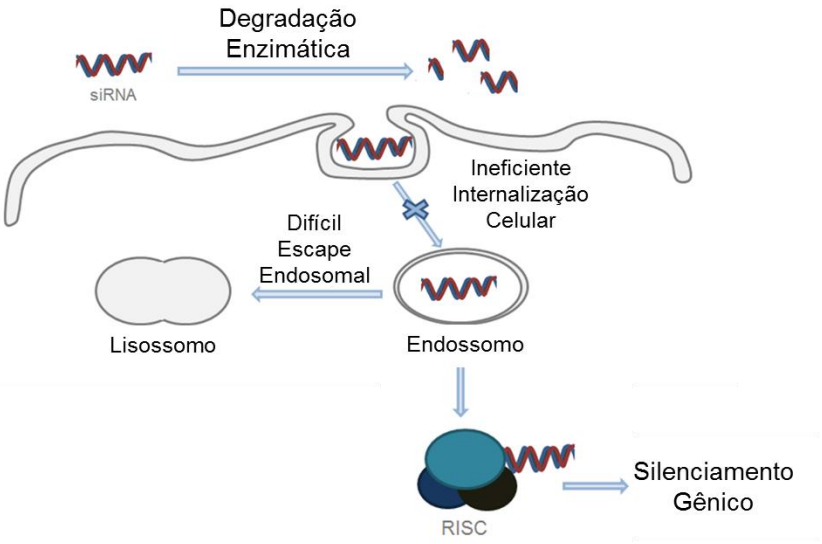

Figura 2. Desafios da terapia com siRNA.

Para um sistema de liberação de siRNA ser efetivo ele deve satisfazer dois requisitos contraditórios: complexar o siRNA de modo a protegê-lo das condições extracelulares e promover a sua internalização celular e, no ambiente intracelular, eficientemente liberar o siRNA no citoplasma. O equilíbrio entre a proteção e a liberação do siRNA no citoplasma celular tem sido o maior desafio dos sistemas de liberação não-virais (CONDE et al., 2015; KAPOOR; BURGESS, 2013; KIM; PARK; SONG, 2013; LIU et al., 2011) e muitas vezes isto justifica a menor eficiência de silenciamento por siRNAs veiculados por estes sistemas quando comparados aos sistemas virais. Os sistemas virais, embora tenham alta eficiência de transfecção, apresentam muitos riscos relacionados às reações imunes e tóxicas além de possível recombinação viral, assim, as questões de segurança são um obstáculo para seu uso (GHOSN et al., 2010; REISCHL; ZIMMER, 2009).

Os sistemas de liberação não-virais normalmente consistem de complexos formados entre polímeros ou lipídeos catiônicos e siRNA. Eles são bastante promissores devido a sua segurança, mas a supressão da expressão gênica mediada por estes carreadores ainda é baixa quando comparada aos vetores virais (REISCHL; ZIMMER, 2009) pelos motivos descritos acima. Os lipídeos e polímeros catiônicos formam complexos com siRNA através de interações eletrostáticas de sua carga positiva com a carga negativa do siRNA. As interações eletrostáticas devem ser suficientemente estáveis para sustentar a complexação do ácido nucléico com o lipídeo ou polímero catiônico durante o seu transporte até a célula alvo - protegendo-

o da degradação- e promover a sua internalização celular. A complexação siRNA/carreador catiônico evita os problemas de repulsão pela membrana celular que tem carga residual negativa e diminui o tamanho dos ácidos nucléicos devido à condensação da molécula (BEYERLE et al., 2011; GÜNTHER et al., 2011; LIU et al., 2011; SCHROEDER et al., 2010; WONG; PELET; PUTNAM, 2007).

Os ácidos nucléicos podem ser internalizados nas células por diversas vias de entrada e a preferencialmente utilizada dependerá das características do seu sistema carreador (tamanho, carga superficial, conformação e presença de ligantes) e da linhagem celular (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010; VERCAUTEREN et al., 2012). A principal via de entrada do siRNA na célula é por endocitose (SCHROEDER et al., 2010). A endocitose pode ser mediada por clatrina, via preferencial de lipoplexos, ou por caveolina, via de internalização efetiva de poliplexos (FERREIRA et al., 2014; REJMAN; CONESE; HOEKSTRA, 2006). O destino intracelular dos ácidos nucléicos está relacionado ao mecanismo de internalização celular e subsequente processamento intracelular (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010; VERCAUTEREN et al., 2012), como por exemplo a endocitose mediada por clatrina pode levar a degradação lisossômica do siRNA (FERREIRA et al., 2014). Foi proposto que o escape endossomal de complexos internalizados pela endocitose mediada por clatrina ocorre pela desestabilização da membrana do endossoma pela presença dos lipídeos presentes nestes complexos. Caso esta desestabilização não ocorra, o conteúdo não será liberado no citoplasma e ocorrerá a degradação lisossomal. Na endocitose mediada por caveolina, o escape endossomal ocorre principalmente pela ruptura osmótica do endossomo num processo denominado “efeito esponja de prótons” (REJMAN; CONESE; HOEKSTRA, 2006). Assim, o complexo precisa ter características adequadas para que ocorra o escape endossomal (SCHROEDER et al., 2010).

A alta eficiência de transfecção de ácidos nucléicos promovida por polímeros catiônicos como por exemplo a polietilenoimina (PEI) se deve em grande parte à maneira como este facilita o escape endossomal pelo processo “efeito esponja de prótons” (GÜNTHER et al., 2011). Após a endocitose, o endossoma acidifica protonando as aminas dos polímeros e lipídeos catiônicos que tem pKa normalmente entre 7 e 5. Isto é seguido por um influxo de prótons adicionais bem como íons cloreto. A captação de íons gera um desequilíbrio osmótico, resultando em um influxo de água para alcançar o equilíbrio. O endossomo então se incha até o seu rompimento. A

ruptura do endossomo libera o conteúdo para o citoplasma (GÜNTHER et al., 2011; SCHROEDER et al., 2010). Uma vez no citoplasma, caso o complexo ainda não tenha sido dissociado, é necessário que as interações eletrostáticas permitam a dissociação do complexo para que o siRNA fique disponível para a maquinaria celular e exerça sua atividade terapêutica (SCHROEDER et al., 2010). Acredita-se que apenas 1-2% do siRNA liberado por nanopartículas lipídicas, por exemplo, são liberadas no citosol e estão disponíveis ao RISC (GILLERON et al., 2013).

Assim, em princípio, um sistema de liberação de siRNA ideal deve (SCHROEDER et al., 2010):

- proteger o siRNA da degradação enzimática,
- evitar a eliminação precoce,
- administrar o siRNA em tecidos alvos e evitar a toxicidade em outros tecidos,
- aumentar a internalização em células alvo,
- facilitar o escape endosomal e,
- liberar o siRNA no citoplasma.

As características necessárias para um sistema de liberação ser efetivo também irá depender da via de administração deste sistema e do tecido alvo. Uma apreciação do tecido ou fisiologia do órgão e análise da patologia envolvida é fundamental para projetar e otimizar o sistema de liberação.

1.2.2. Sistemas de liberação para administração localizada de siRNA

O siRNA pode ser administrado sistemica ou localmente. A administração sistêmica de siRNAs deve lidar com diversos desafios além dos inerentes da aplicação de siRNA, como interação dos siRNAs com componentes do sangue, a depuração renal e permeação dentro do tecido, além de problemas de toxicidade em tecidos não-alvo (PEER; LIEBERMAN, 2011; SARETT; NELSON; DUVALL, 2015). A administração local pode superar estes desafios e apresenta várias vantagens como possibilita administração de doses menores, permite liberação local e sustentada e diminui a imunoestimulação (CONDE et al., 2015; GUZMAN-VILLANUEVA et al., 2012; VICENTINI et al., 2013b). A administração localizada de siRNA através do pulmão, vagina, pele, sistema nervoso, olho ou intratumoralmente tem mostrado benefícios em relação a administração sistêmica para o tratamento de patologias que acometem estes tecidos. Além de ser interessante na regeneração de tecidos (SARETT; NELSON; DUVALL, 2015; VICENTINI et al., 2013b). Porém, em algumas

patologias como carcinomas metastáticos e infecções sistêmicas, a administração sistêmica é necessária (SARETT; NELSON; DUVALL, 2015).

Entre os sistemas para administração localizada, os sistemas de geleificação *in situ* são uma interessante abordagem para a liberação de siRNA (BORGHETI-CARDOSO et al., 2014, 2015; HAN et al., 2011; KIM; PARK; SONG, 2012, 2013; KREBS; JEON; ALSBERG, 2009; NGUYEN; DANG; ALSBERG, 2013). Estes sistemas apresentam várias vantagens como serem minimamente invasivos e dolorosos quando comparados aos implantes porque eles podem ser injetados através de uma seringa no corpo e, após injeção, eles formam um gel localmente, que pode promover uma liberação sustentada do fármaco (HATEFI; AMSDEN, 2002; PACKHAEUSER et al., 2004).

Baseado no mecanismo de formação de gel *in situ* estes sistemas podem ser classificados em:

(i) Pastas termoplásticas, que são sistemas poliméricos injetados fundidos 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 remoção de solvente, mudança na temperatura ou alteração de pH;

(iv) solidificação *in situ* de organogels, que são compostos de lipídeos polares ou outras anfifilas os quais intumescem na presença de água e formam vários tipos de cristais líquidos liotrópicos (BORGHETI-CARDOSO et al., 2013; HATEFI; AMSDEN, 2002; PACKHAEUSER; KISSEL, 2007).

Os primeiros sistemas de geleificação *in situ* para liberação de siRNA foram obtidos pelo método de *crosslinking in situ* ou precipitação (HAN et al., 2011; KREBS; JEON; ALSBERG, 2009). Embora estes sistemas tenham liberado o siRNA localmente, a liberação do siRNA a partir destes géis não foi controlada. Além disto, o siRNA foi liberado sem estar complexado ao carreador, o que pode resultar em curto tempo de meia-vida e baixa eficiência de transfecção (KIM; PARK; SONG, 2012; NGUYEN; DANG; ALSBERG, 2013). Além disto o método de *crosslinking* e precipitação podem ser prejudiciais ao tecido e ao siRNA (PACKHAEUSER et al., 2004). Por outro lado, os organogéis que se solificam *in situ* sob condições biológicas

no local de administração podem superar estes desafios. Os organogéis podem ser obtidos a partir de lipídeos anfifílicos tais como monoglicerídeos (MO) (Figura 3) que absorvem água do meio e se rearranjam em estruturas líquido cristalinas (AGARWAL; RUPENTHAL, 2013; CHANG; BODMEIER, 1997a, 1997b, 1998; HATEFI; AMSDEN, 2002; LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005; RIZWAN et al., 2009; YAGHMUR; RAPPOLT; LARSEN, 2013).

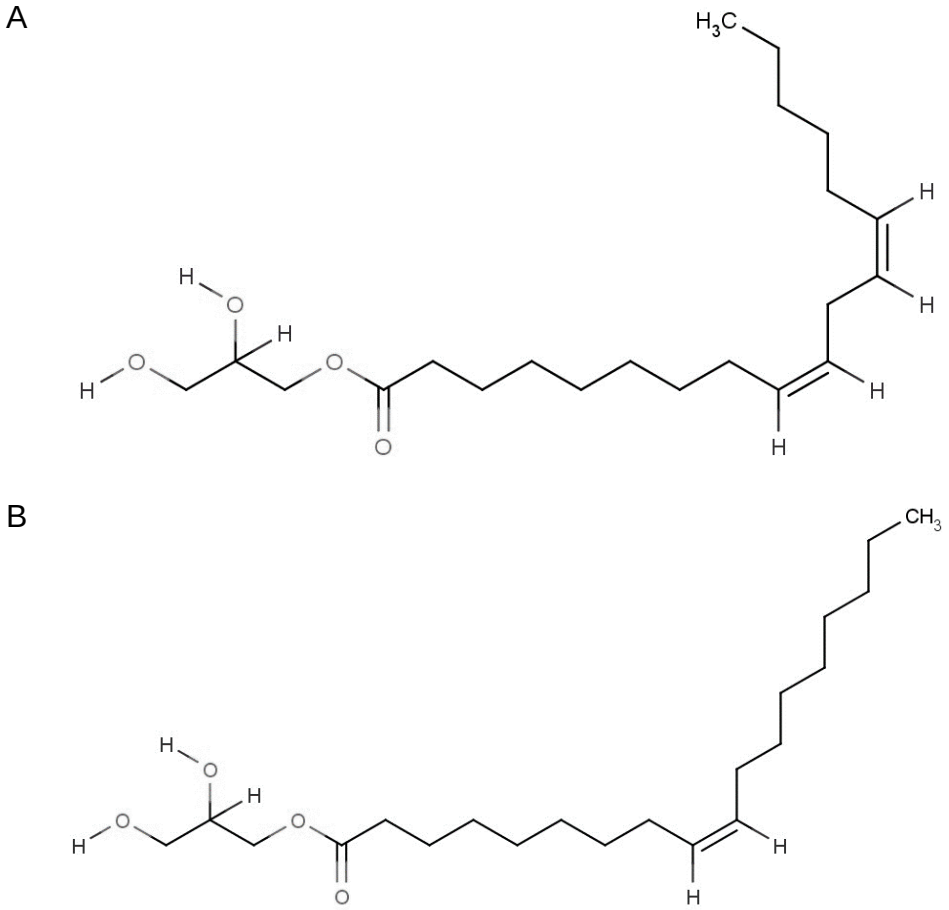

Figura 3. Estrutura química dos principais monoglicerídeos usados na obtenção de cristais líquidos: (A) monolinoleato de glicerila (monolinoleina) e (B) monoleato de glicerila (monoleína).

1.2.3. Sistemas líquido cristalinos

Os 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 os cristais sólidos e os líquidos isotrópicos é o estado de ordem. Nos cristais as moléculas estão altamente organizadas enquanto nos líquidos as moléculas se difundem livremente (SINGH, 2000). Eles 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 e cúbica (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

A fase lamelar (Figura 4A) consiste de estruturas lineares de bicamadas lipídicas alternadas entre canais de água e pode ser usada para obter a fase cúbica devido a sua habilidade de absorver excesso de água dos fluidos biológicos. A fase cúbica (Figura 4D, E e F) consiste de bicamadas lipídicas curvas em três dimensões separadas por canais de água, é formada com o aumento de água e é altamente viscosa e fisicamente estável, podendo ter a conformação Im3m, Pn3m e Ia3d (LARSSON, 1989). A fase hexagonal (Figura 4B e C) é caracterizada por longas estruturas cilíndricas bidimensionais, podendo existir na forma de 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 na forma de fase normal, onde as cabeças polares da anfifila localizam-se na região externa dos cilindros (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001).

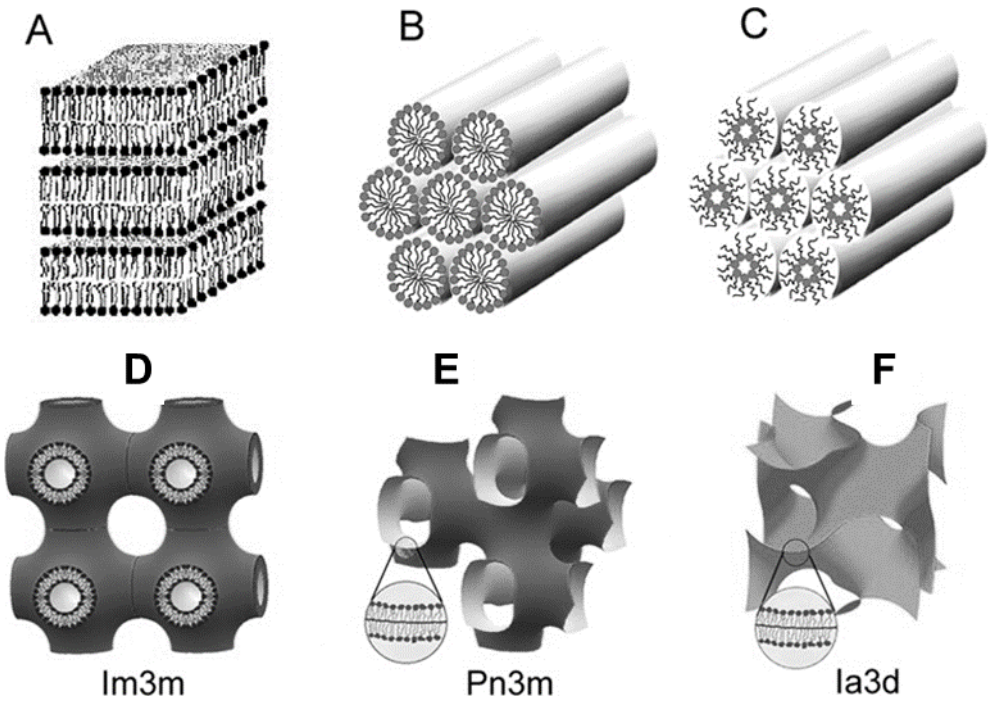

Figura 4. Fases líquido cristalinas: (A) fase lamear; (B) fase hexagonal; (C) fase hexagonal inversa; (D) fase cúbica bicontinua Im3m; (D) fase cúbica bicontinua Pn3m e (E) fase cúbica bicontinua Ia3d. Adaptada com autorização de (KOYNOVA; TENCHOV; MACDONALD, 2015). Copyright (2015) American Chemical Society.

A mudança de uma fase menos viscosa, como por exemplo a fase lamelar, em estrutura bicontinua cúbica ou fase hexagonal reversa pode ser explicada pelo fator de empacotamento (*K*). O fator de empacotamento relaciona a forma da molécula com propriedades que influenciam a curvatura da interface polar-apolar e, conseqüentemente, o tipo de agregado formado. Portanto, o fator de empacotamento é um parametro muito útil para predizer a mesofase que é preferencialmente formada por uma anfifila e pode ser calculada pela equação 1 (MITCHELL; NINHAM, 1981):

$$k = \frac{Vh}{Ao.Lc}$$ (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 (MITCHELL; NINHAM, 1981).

Os valores do fator de empacotamento são normalmente ~1 para fase lamelar (ENGSTROM; ENGSTROM, 1992), ~1,3 para fase cúbica bicontinua e ~1,7 para fase hexagonal reserva (LARSSON, 1989). A Figura 5 relaciona o fator de empacotamento com os tipos de fases formadas.

O aumento do conteúdo de água permite que os grupos das cabeças polares do MO se movam mais livremente em uma direção perpendicular relativa ao plano da camada de água. Estes movimentos promovem desordem da cadeia hidrofóbica do MO, aumentando assim *Vh*. Como a interação dos grupos da cabeça polar são fortes, devido a pontes de hidrogênio, a sua seção transversal tende a ser constante. Assim, o fator de empacotamento aumento porque *Vh* aumenta, enquanto *Ao* e *Lc* permanecem constante, facilitando a transformação de fase lamelar para fase cúbica (AMAR-YULI; GARTI, 2005).

O tipo de sistema líquido cristalino formado irá depender das propriedades estruturais dos lipídeos, temperatura, característica dos componentes incorporados e quantidade de água no sistema devido estes fatores alterarem o fator de empacotamento dos lipídeos anfifílicos (CHANG; BODMEIER, 1998; FONG; HANLEY; BOYD, 2009).

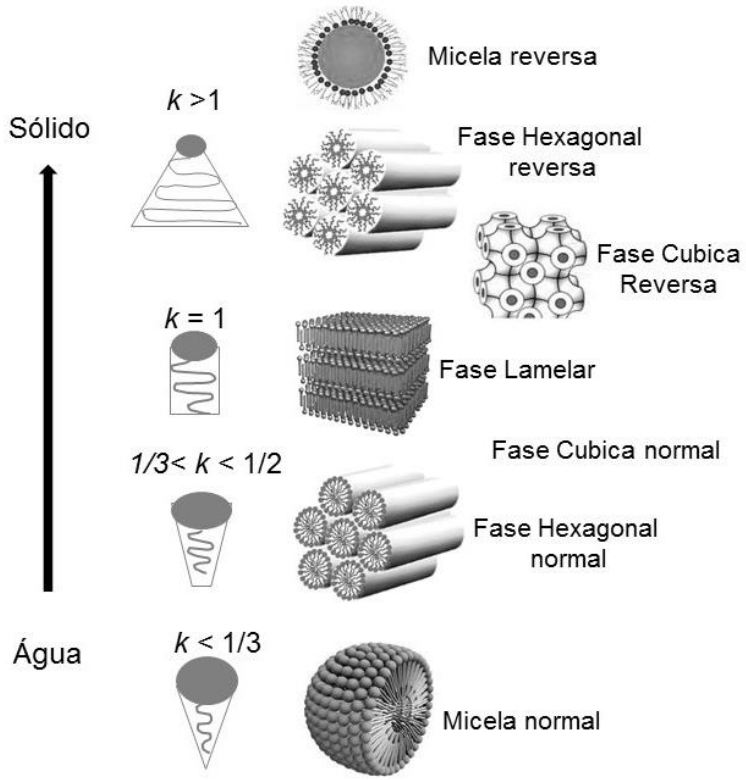

Figura 5. Relação entre o fator de empacotamento e as estruturas líquido cristalinas formadas. Adaptado de (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001; LOPES, 2005).

Os sistemas líquido cristalinos são de grande interesse para a administração de fármacos, peptídeos e genes porque eles podem incorporar compostos com diferentes solubilidades, proteger os fármacos da degradação física e enzimática, aumentar sua penetração na pele e controlar a sua liberação (LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011; LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007; LOPES et al., 2006a, 2006b; MOEBUS; SIEPMANN; BODMEIER, 2012; VICENTINI et al., 2013a; YARIV et al., 2010).

Baseado nas vantagens da administração localizada de siRNA e da formação de gel *in situ* pelo mecanismo de solidificação *in situ* de organogel, na presente pesquisa, foi proposto um sistema de liberação localizada para administração de siRNA obtido a partir de MO. Os MOs são o componente responsável pela formação de cristais líquidos viscosos como a fase cúbica e hexagonal. Propilenoglicol (PG) e tampão tris 0,1M pH 6,5 foram incorporados ao sistema para garantir a fluidez necessária para a injeção da formulação e o PEI 25 kDa foi usado para conferir um

residual de carga positiva ao sistema e assim permitir a formação de complexo entre o sistema e o siRNA.

O PEI (Figura 6) é um polímero sintético solúvel em água que pode ser linear ou ramificado, com uma alta densidade de carga catiônica em pH fisiológico, devido aos seus grupos amina livre (GÜNTHER et al., 2011; KREBS; ALSBERG, 2011). PEI é um dos mais eficientes carreadores de genes não virais devido as suas características de possuir alta densidade de carga e por facilitar o escape endossomal pelo “efeito esponja de prótons” (GÜNTHER et al., 2011; LIU et al., 2011; YIN et al., 2014). A eficiência de transfecção do PEI depende da sua estrutura e peso molecular, sendo que o PEI ramificado de 25 kDa e o de 22 kDa são os mais eficientes. Porém, estes PEIs apresentam certa toxicidade e além disto a eficiência de transfecção ainda é moderada quando comparada aos sistemas virais (GÜNTHER et al., 2011; LIU et al., 2011).

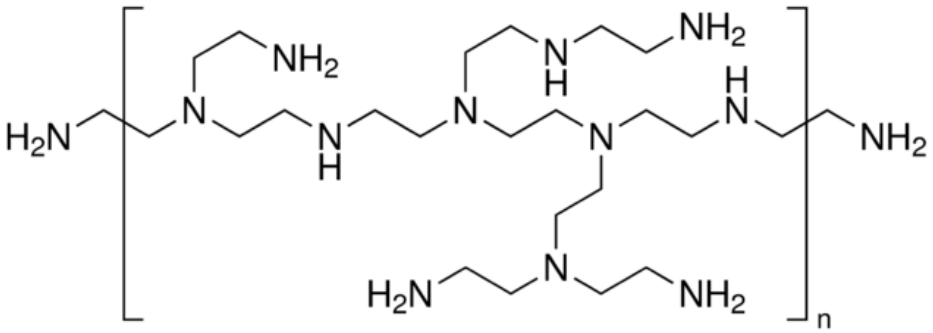

Figura 6. Estrutura química do polímero catiônico polietilenoimina (PEI), 25 kDa, ramificado.

Nos últimos anos tornou-se cada vez mais evidente que o desenvolvimento de novos fármacos por si só não seria suficiente para garantir o progresso nas terapias. Assim, uma estratégia para superar este problema é o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. A principal vantagem desta abordagem é que o destino do fármaco *in vivo* não é mais somente determinado pelas características do fármaco, mas também pelo sistema de liberação, o qual deve proporcionar uma liberação localizada e controlada do fármaco (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

1.3. Câncer de pele

1.3.1. Epidemiologia, etiologia e tratamentos

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes (14,6% do total) em 2012 (FERLAY et al., 2015). Câncer é um termo genérico usado para se referir a um grande número de doenças complexas com crescimento celular irregular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O desenvolvimento de células cancerígenas é um processo multi-etapas, com alteração em uma variedade de eventos de sinalização celular que levam a modificações no perfil da expressão de determinados genes (GUO et al., 2011). Estas mudanças alteram a função das células permitindo a expressão de sinais de crescimento, inibição da apoptose, ilimitado potencial de replicação, angiogênese, invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011; URIBE; GONZALEZ, 2011).

O câncer de pele é o tumor maligno mais comum nos seres humanos, especialmente, na população branca (D'ORAZIO et al., 2013; SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). Na população brasileira, para o biênio 2016-2017, estima-se que ocorrerão aproximadamente 180 mil casos novos de câncer de pele não melanoma e 6 mil de melanoma, o que corresponde a 30% dos casos novos de câncer no país (SILVA, 2015).

Os cânceres de pele são denominados de acordo com as células a partir das quais eles surgem e de seus comportamentos clínicos. Os três tipos de cânceres mais comuns são os carcinomas de células basais, os carcinomas de células escamosas e os melanomas (ARMSTRONG; KRICKER, 2001; D'ORAZIO et al., 2013; NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010). Os carcinomas de células basais e os carcinomas de células escamosas também são conhecidos como carcinoma de pele não melanoma. A sua incidência é bem maior do que a incidência de melanoma, mas felizmente, eles são mais fáceis de tratar e tem um prognóstico melhor. Embora a mortalidade seja baixa nestes cânceres, principalmente devido ao fato de serem localizados, eles podem resultar em desfiguração significativa, levando a consequências físicas e emocionais adversas para os pacientes. Além disto, estes cânceres, que causam considerável morbidade, colocam um enorme fardo sobre os sistemas de saúde em todo o mundo (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010; SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). O carcinoma de células escamosas, que corresponde a 15-20% de todos os cânceres de células não melanomas, é mais propenso a invadir outros tecidos, e pode causar a morte (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010; SIMÕES;

SOUSA; PAIS, 2015). É relatado que no carcinoma de células escamosas há risco de metástase em 12% dos casos (URIBE; GONZALEZ, 2011).

Os carcinomas de células basais e os de células escamosas são derivados de queratinócitos e o melanoma de melanócitos (Figura 7) (GARCIA-URIBE et al., 2012; NYS; AGOSTINIS, 2012). Os queratinócitos são as principais células da pele constituindo cerca de 90-95% da epiderme, que é a camada mais externa da pele tendo a função de barreira. A epiderme está em constante renovação devido a atividade mitótica das células da camada basal que originam os novos queratinócitos, que então, passam por um processo de diferenciação induzido pelo processo de morte celular se movendo para a camada externa da epiderme onde se tornam os corneócitos. Na epiderme os queratinócitos estão em contato com os melanócitos, que são células produtoras de pigmento (ERNFORS, 2010; HOUBEN; DE PAEPE; ROGIERS, 2007).

O aumento da incidência de câncer de pele nas últimas décadas é uma consequência direta da exposição à genotóxica e mutagência radiação ultravioleta (UV). A maioria das propriedades mutagênicas e cancerígenas da luz solar tem sido atribuída ao UVB. Quando uma célula é danificada gravemente pelo UVB e os mecanismos de reparo da célula não são suficientes para reverter os danos, a célula entra em processo de apoptose. Este processo é muito importante para impedir a sobrevivência das células lesadas que frequentemente carregam genes supressores de tumor ou protooncogenes mutados e que podem ser transmitidos aos seus descendentes (NYS; AGOSTINIS, 2012). Quando a processo de apoptose falha e as células danificadas sobrevivem pode-se resultar em câncer. É importante ressaltar que estudos recentes sugerem que o desenvolvimento de células epidérmicas em tumores malignos ocorre por mais de uma via, como é evidenciado pelos diferentes perfis moleculares, distintas distribuições anatômicas e diversos fatores de risco para subgrupos de cânceres de pele (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

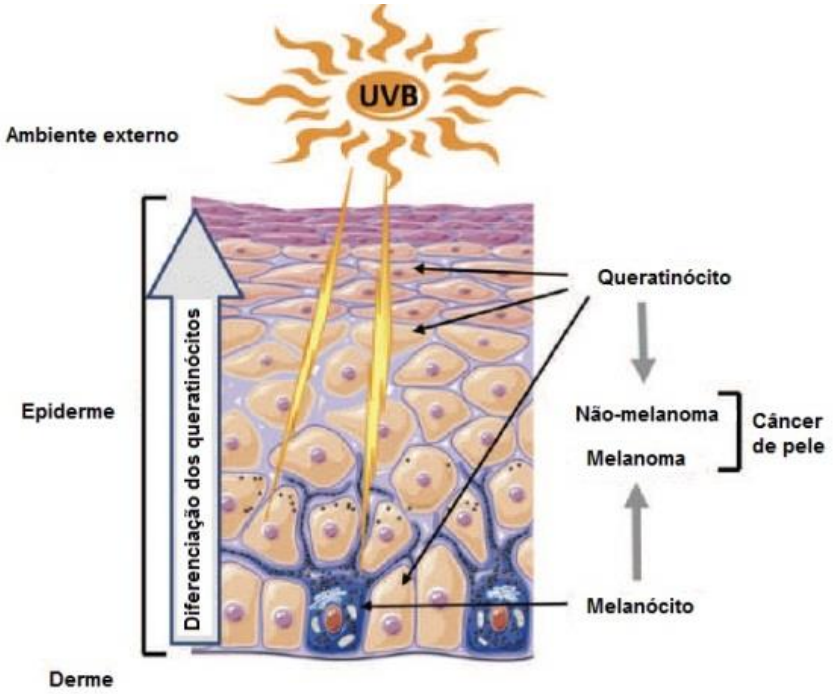

Figura 7. Representação esquemática da epiderme humana. Sob a exposição excessiva de radiação UVB pode ser desenvolvido o câncer de pele. Adaptado com autorização de (NYS; AGOSTINIS, 2012). Copyright (2012), com permissão de Elsevier.

O tratamento do câncer é tão complexo quanto o seu desenvolvimento. A terapia anti-câncer ideal deve matar as células cancerígenas sem afetar as células saudáveis. Atualmente, o sucesso da terapia anti-câncer depende principalmente do estado da doença no momento do diagnóstico e a terapia é normalmente baseada na remoção cirúrgica do tumor, quimioterapia, radioterapia ou na combinação destas. No câncer de pele a retirada do tumor por cirúrgia continua sendo o principal tratamento (CLARKE, 2012; LAZARETH, 2013). O tratamento do câncer de pele tem três objetivos centrais: erradicação completa do câncer, preservação da função normal da pele e cuidado com a cosmética (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). Embora as terapias anti-cânceres tenham evoluído, elas ainda apresentam limitações e estão longe de ser o ideal. Portanto, novas pesquisas e tratamentos inovadores são necessários.

A descoberta do silenciamento gênico por siRNA apresentou novas oportunidades para a terapia do câncer (GUO et al., 2011). O siRNA está sendo empregado no silenciamento de genes envolvidos em diversas vias que levam ao desenvolvimento e progressão do câncer incluindo as vias de oncogênese, angiogênese (KIM et al., 2008; SALVA et al., 2012; SCHIFFELERS et al., 2004), apoptose, regulação do ciclo celular (BROWN et al., 2010; NYS; AGOSTINIS, 2012),

senescência celular, interação tumor-hospedeiro e resistência às terapias convencionais (HAN et al., 2011).

Na terapia do câncer a administração sistêmica tem sido extensivamente utilizada, embora alguns carcinomas são ideais para administração localizada como os cânceres de pele (SARETT; NELSON; DUVALL, 2015). As terapias localizadas permitem o acúmulo da substância no tumor sem toxicidade no resto do corpo, porém não permitem atingir as mestastases (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). A administração intratumoral de hidrogéis que formam gel *in situ* contendo siRNA se mostrou eficiente e segura para a terapia do câncer em estudos com animais (HAN et al., 2011; KIM; PARK; SONG, 2012, 2013; SEGOVIA et al., 2015).

Ao longo dos anos, o aumento do conhecimento sobre os processos envolvidos na carcinogênese, no crescimento e na transformação maligna do tumor tem resultado na identificação de alvos moleculares relevantes para o tratamento do câncer. A família HER dos receptores de tirosina quinase é uma das mais estudadas redes de sinalização que contribuem com o desenvolvimento e crescimento do tumor. Assim, um alvo atraente para a terapia do câncer é o receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, *epidermal growth fator receptor* (EGFR)) (CHO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010).

1.3.2. Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O EGFR é uma glicopreoteína transmembrânica de 170 kDa que pertence a família de receptores também conhecidos como receptores tipo 1 de tirosina quinase ou família dos receptores ErbB. Esta família é composta de quatro receptores intimamente relacionados: o próprio receptor EGFR (ErbB1/HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Cada um destes receptores é composto por 3 domínios: o domínio de ligação extracelular, o segmento lipofílico transmembrânico e o domínio intracelular da proteína tirosina quinase com um segmento de regulação carboxílico terminal (CT) (WELLS, 1999; YARDEN, 2001). O domínio extracelular é uma estrutura dinâmica que pode se organizar em uma estrutura fechada com baixa afinidade pelo ligante ou uma estrutura aberta com alta afinidade pelo ligante. O segmento CT no domínio intracelular contém resíduos de tirosina que modulam a transdução de sinal mediada pelo EGFR após fosforilação. O CT também tem vários resíduos de treonina e serina, cuja fosforilação parece estar

envolvida nos processos de endocitose e *downregulation* do receptor (FERGUSON, 2004; NORMANNO et al., 2006).

A ativação do EGFR ocorre quando os ligantes, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de transformação de crescimento α (TGF-α), afiregulina, betacelulina, EGF ligado a heparina ou epiregulina, se ligam ao receptor apresentando a conformação aberta. Este evento resulta na fosforilação de diversos substratos intracelulares, ativando certo número de cascatas que conduzem o sinal para o núcleo (Figura 8). As quatro vias de sinalização mais conhecidas são a proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), o fosfatidilinositol-3-OH quinase (PI3K)/Akt, o transdutor de sinal e ativador de transcrição mediado por STAT e a via fosfolipase Cy (PLCy). Cada sinal vai ativar a expressão de genes e, por fim, induzir respostas celulares, tais como a proliferação celular, diferenciação, invasão, migração, adesão, sobrevivência e reparação celular (CHOI et al., 2010; KALINOWSKI et al., 2012; NORMANNO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006).

O EGFR é expresso em todos os tipos celulares exceto em células hematopoéticas. Na maioria dos cânceres humanos epiteliais, tais como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, câncer do pulmão de não pequenas células, câncer de colo, câncer de mama e câncer pancreático, ocorre uma super expressão do EGFR (BARO et al., 2014; EIBLMAIER et al., 2008). É relatado que a expressão de EGFR é desregulada em pelo menos 33-50% dos tumores epiteliais humanos (SEBASTIAN et al., 2006). Em relação aos cânceres de pele, EGFR foi detectado em aproximadamente 50% dos carcinomas de células basais e cerca de 100% dos carcinomas de células escamosas, sendo super expresso em 73% dos casos dos carcinomas de células escamosas. No carcinoma de células escamosas, esta superexpressão parece também conduzir à um fenótipo mais agressivo do câncer (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015; URIBE; GONZALEZ, 2011).

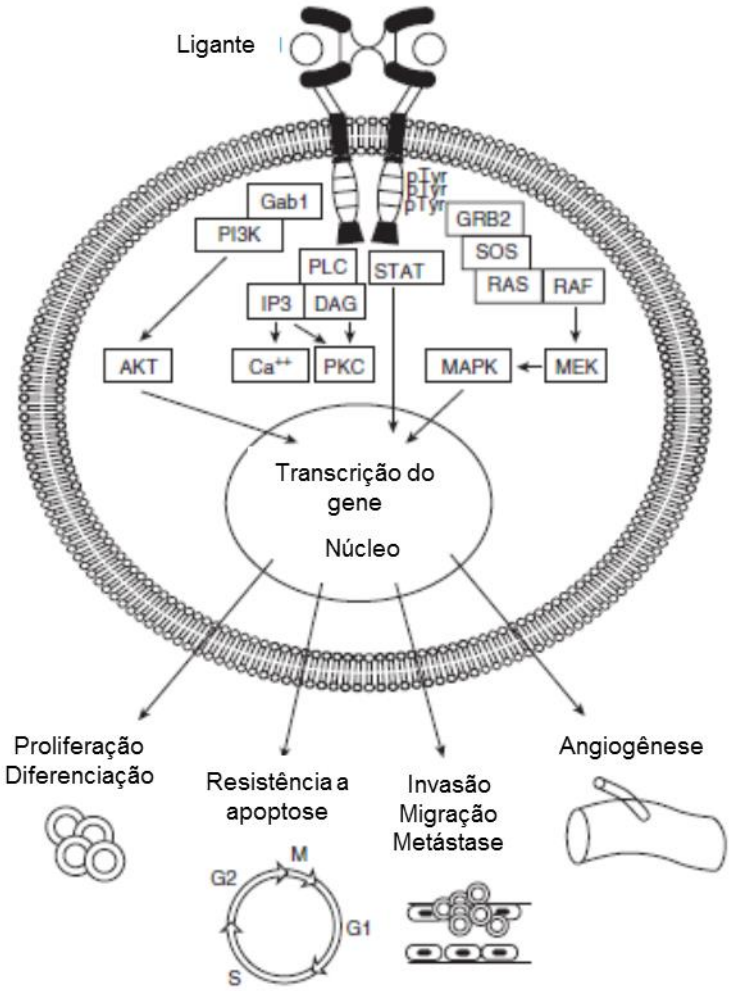

Figura 8. Ativação do EGFR e sinal de transdução. A ligação do ligante ao EGFR resulta em fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio terminal carboxílico, recrutamento de proteínas de sinalização e, por último, a fosforilação de substratos intracelulares ativando várias vias de transdução de sinal. Estas vias transmitem o sinal para o núcleo e modulam a transcrição celular e a progressão do ciclo celular. Por fim, estes efeitos no núcleo são traduzidos em aumento da diferenciação, proliferação e resistência à apoptose. Além disso, invasão, migração e metástase das células são promovidas e angiogénese é estimulada. DAG: diacilglicerol, IP3: inositol trifosfato, MAPK: proteíno-quinases ativadas por mitógenos, MEK: quinase MAPK, PKC: proteína quinase C, PI3K: fosfatidilinositol-3-OH quinase, PLC: fosfolipase C, STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição. Adaptado com autorização de (OLIVEIRA et al., 2006). Copyright (2006) Taylor & Francis.

Desde que foi mostrado que o EGFR está envolvido na iniciação, crescimento e metastese de muitos tumores humanos, várias estratégias para reduzir a atividade deste receptor têm sido desenvolvidas (CHOI et al., 2010). Estas estratégias podem ser divididas em três tipos dependendo da localização onde a ação é realizada (Figura 9) (OLIVEIRA et al., 2006):

- no domínio extracelular do EGFR, interferindo com a ligação do ligante o ao receptor, por exemplo, pela utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) como o cetuximab e

panitumumab que são aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (CIARDIELLO; TORTORA, 2008);

- no domínio intracelular, inibindo a ativação da proteína tirosina-quinase, como por exemplo usando inibidores da tirosina quinase como o erlotinib e o gefinitinib (aprovados pelo FDA) (CIARDIELLO; TORTORA, 2008).
- no nível do RNAm, interferindo com a produção de EGFR, por exemplo, utilizando siRNA que promove a degradação do RNAm que codifica a proteína EGFR e assim reduzindo a sua expressão na célula.

Intervindo na expressão ou inativação do EGFR através do uso de mAbs, inibidores de tirosina quinase ou interferentes de RNAm, obtem-se atividades antitumorais por vários efeitos celulares tais como controle do ciclo celular, indução da apoptose, diminuição da proliferação celular, redução da capacidade de mestastase e inibição da angiogênese.

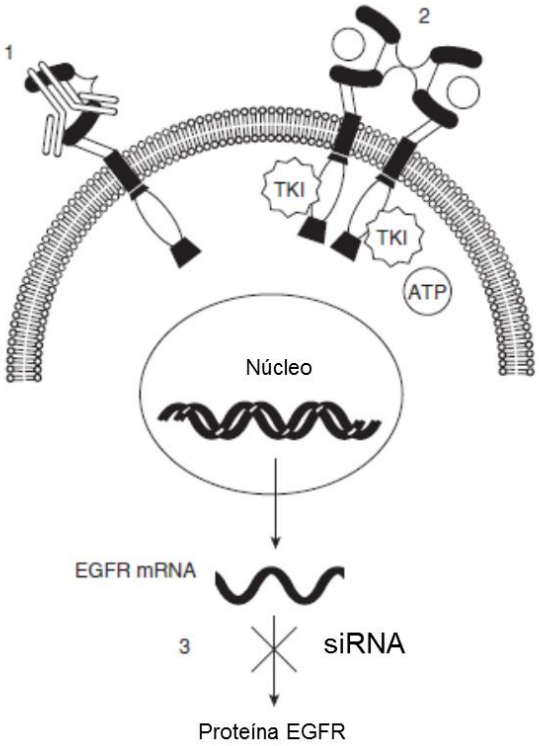

Figura 9. Estratégias para bloquear a transdução de sinais pelo EGFR pode ser feito em 3 diferentes níveis: (1) no domínio extracelular do EGFR interferindo na ligação do ligante com o receptor; (2) no domínio intracelular, inibindo a ativação da proteína tirosina quinase; (3) a nível de RNAm, pela inibição da tradução do RNAm. TKI: inibidor da tirosina quinase. Adaptado com autorização de (OLIVEIRA et al., 2006). Copyright (2006) Taylor & Francis.

Embora muitos testes clínicos têm mostrado que as terapias com mAbs e inibidores da tirosina quinase têm sido promissores no tratamento de tumores, a baixa eficácia em alguns casos requer o desenvolvimento de terapias mais efetivas contra este alvo. A baixa eficácia tem sido relacionada ao fato de tumores adquirirem resistência a estas terapias (WHEELER; DUNN; HARARI, 2010). A resistência adquirida ou intrínseca das células em relação a estes agentes terapêuticos pode ocorrer por vários mecanismos tais como (i) mutações dentro do EGFR e em seus efetores de *downstream* que ativam a sinalização, (ii) sinalização compensatória através de outros receptores de tirosina quinase e (iii) transição de um fenótipo epitelial para mesenquimal (KALINOWSKI et al., 2012).

Alguns estudos também têm mostrado que estes agentes podem ser efetivos para uns tumores, mas não são para outros. Como por exemplo, os testes clínicos com radiação em combinação com cetuximab tiveram resultados promissores no tratamento de câncer de cabeça e pescoço, porém os estudos combinando quimioterapia e radioterapia com cetuximab não demonstraram diferenças significativas no tratamento de câncer de pulmão de não pequenas células (RABEN et al., 2005). Vários testes clínicos de fase III corroboram com este resultado, mostrando que o cetuximab não melhorou significativamente os resultados clínicos em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (QIAN et al., 2014). O uso de erlotinib ou gefitinib combinados com quimioterapia também não mostraram diferenças quando comparado com a quimioterapia sozinha (GATZEMEIER et al., 2007; HERBST et al., 2004). A maioria dos pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células também não respondem ao gefitinib, apenas 10% destes pacientes tiveram uma boa resposta clínica a esta terapia. Algumas mutações no domínio da tirosina quinase do gene EGFR foram as responsáveis por conferir resposta a este inibidor de tirosina quinase (LYNCH et al., 2004). Portanto, novas estratégias são necessárias para efetivamente bloquear a atividade deste receptor ou silenciar o gene EGFR e, assim, inibir todas as vias de sinalização que a sua ativação desencadeia.

Neste contexto o uso de siRNA, que interefere no nível de RNAm é uma abordagem promissora para a inibição da síntese de EGFR e esta estratégia tem se mostrado eficiente na terapia do câncer tanto aplicada sozinha quando combinada à outras terapias (CHEN et al., 2012; LI et al., 2008; ZHANG et al., 2013).

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. Como por exemplo, a atividade do siRNA dura de 3-7 dias em células proliferativas enquanto que em células tais como neurônios tem atividade por 3 semanas (MASIERO et al., 2007). Desta forma, sistemas de liberação localizada e sustentada são bastante promissores para a liberação de siRNA em células tumorais, uma vez que o período de retenção do siRNA nestas células é bastante curto.

Neste contexto, a presente pesquisa propôs uma nova abordagem para a terapia gênica do câncer de pele empregando sistemas de geleificação *in situ* para administração intratumoral de siRNA.

6. CONCLUSÃO

Os experimentos realizados nesta pesquisa e a discussão dos seus resultados permitiram concluir que:

- A FFP composta de MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p) em excesso de água forma um gel caracterizado como uma mistura de fase cúbica e fase hexagonal. A presença de siRNA complexada a FFP não altera a estrutura líquido cristalina do gel formado em excesso de água, mas aumenta o parâmetro de rede;
- O estudo de liberação *in vitro* mostrou que o gel obtido a partir da FFP libera o siRNA de maneira sustentada e o siRNA é liberado complexado ao PEI;
- A FFP pode ser eficientemente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm;
- A FFP foi capaz de complexar até 15 mM de siRNA e de proteger o siRNA da degradação como mostrado no ensaio usando 25% de SFB;
- A citotoxicidade da FFP é proporcional ao volume de FFP administrado às células e o siRNA complexado à FFP diminui a citotoxicidade da mesma nas células A431, A549, FaDu e HeLa;
- O siRNA liberado do G-FFP foi internalizado por todas as linhagens celulares avaliadas (A431, FaDu, HeLa, A549, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GF) e a quantidade de siRNA internalizado é dependente da linhagem celular;
- O siRNA liberado do G-FFP foi capaz de promover silenciamento da expressão gênica de firefly luciferase (gene exógeno modelo) nas células HeLa e FaDu. Nas células A549 não hove diferença entre as células tratadas com siRNA não-especifico e siLuc para todos os carreadores avaliados. Esta avaliação do silenciamento gênico não foi realizada para as demais linhagens celulares (A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GF);
- O siRNA liberado do G-FFP não foi capaz de promover silenciamento da expressão de EGFR (proteína endógena alvo) nas células A431, FaDu, A549 e HeLa. O complexo PEI/siRNA em tampão tris promoveu o silencimaneto desta proteína nas células A431, A549 e HeLa. Esta avaliação do silenciamento gênico não foi realizada nas células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GF;
- A FFP administrada intratumoralmente forma gel *in situ* que permanece no tecido tumoral por pelo menos 14 dias;
- No estudo piloto com camundongos nude administrando FFP complexada ou não com EGFR siRNA, não foi observada redução na expressão de EGFR por WB ou IHQ, nem a redução de RNAm por RT-PCR nos tumores 24 h, 7 e 14 dias após administração da FFP com siRNA. A FFP complexada com EGFR siRNA promoveu

uma redução de 30% no tamanho do tumor 3 dias após a administração intratumoral quando comparado com a FFP sem siRNA.

Estes experimentos também permitiram confirmar quão desafiador é a administração terapêutia de siRNA. Observou-se que:

- Não há uma relação direta entre a eficiência de internalização celular e eficiência de silenciamento gênico promovida pelo sistema desenvolvido;
- A falta de eficiência em silenciar a proteína de interesse pode ser devido a problemas de escape endossomal, mas também devido a características da própria proteína como tempo de meia-vida, taxa de transcrição, quantidade e localização na célula.

Em suma, o gel obtido a partir da FFP composta de MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p) em excesso de água, caracterizado como uma mistura de fase cúbica e hexagonal, libera o siRNA de maneira sustentada e complexado ao PEI. A FFP é capaz de complexar e proteger altas concentrações de siRNA, promover a sua internalização celular e o silenciamento de genes de interesse. A capacidade de internalizar e promover o silenciamento gênico é célula dependente e proteína alvo dependente. Além disto, a FFP forma gel *in situ* após ser administrada intratumoralmente, e uma única dose de siRNA EGFR aplicada intratumoralmente resultou em 30% de redução no tamanho do tumor após 3 dias da administração.

Diante dos resultados obtidos, considera-se o sistema de liberação desenvolvido para administração localizada de siRNA eficiente, deixando várias perspectivas para sua otimização, incluindo a possibilidade de ser um sistema para administração de siRNAs para diferentes alvos, objetivando uma terapia anti-câncer efetiva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M. et al. siRNA-mediated down-regulation of P-glycoprotein in a Xenograft tumor model in NOD-SCID mice. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 2516–2529, 2011.

AGARWAL, P.; RUPENTHAL, I. D. Injectable implants for the sustained release of protein and peptide drugs. **Drug Discovery Today**, v. 18, p. 337–349, 2013.

AHMED, A. R.; DASHEVSKY, A.; BODMEIER, R. Drug release from and sterilization of in situ cubic phase forming monoglyceride drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 3, p. 375–380, 2010.

ALLARD, S. T. M.; KOPISH, K. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. **Cell Notes - Promega wbsite**, n. 21, p. 23–26, 2008.

ALVAREZ, R. et al. RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3952–62, 2009.

AMAR-YULI, I. et al. Hexosome and hexagonal phases mediated by hydration and polymeric stabilizer. **Langmuir**, v. 23, n. 7, p. 3637–3645, 2007.

AMAR-YULI, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Solubilization of nutraceuticals into reverse hexagonal mesophases. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 10171–10180, 2008.

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

ARIMA, H. et al. Folate-PEG-appended dendrimer conjugate with alpha-cyclodextrin as a novel cancer cell-selective siRNA delivery carrier. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 2591–2604, 2012.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, p. 8–18, 2001.

BARO, M. et al. Dasatinib worsens the effect of cetuximab in combination with fractionated radiotherapy in FaDu- and A431-derived xenografted tumours. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 7, p. 1310–1318, 2014.

BERG, K. et al. Photochemical Internalization : A Novel Technology for Delivery of Macromolecules into Cytosol. **Cancer Research**, v. 59, p. 1180–1183, 1999.

BERTRAND, N. et al. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 2–25, 2014.

BEYERLE, A. et al. Comparative in vivo study of poly(ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 1, p. 51–56, 2011.

BITKO, V. et al. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. **Nature**

Medicine, v. 11, p. 50–55, 2005.

BORGES, A. C. **Expressão de um fragmento da Miosina Va inibe o crescimento de tumores de melanoma induzidos em modelo animal**. [s.l.] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2012.

BORGHETI-CARDOSO, L. N. et al. In situ gelling for sustained drug delivery. In: **Recent Advances in Drug Delivery Research**. [s.l.] Nova Sciences Publishers, Inc., 2013. p. 97–126.

BORGHETI-CARDOSO, L. N. et al. Self-assembling gelling formulation based on a crystalline-phase liquid as a non-viral vector for siRNA delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 1, p. 72–82, 2014.

BORGHETI-CARDOSO, L. N. et al. An in situ gelling liquid crystalline system based on monoglycerides and polyethylenimine for local delivery of siRNAs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 103–117, 2015.

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

BORRA, R. C. et al. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 3, p. 255–262, 2009.

BOUCEK, J. et al. In vitro efficacy of HPMA based conjugates containing doxorubicin and anti-EGFR mAb. **Molecular Cancer Therapeutics - Novel Drug Delivery Systems: Poster Presentations**, v. 6, p. C116, 2007.

BROWN, M. S. et al. CK2 modulation of NF-kappaB, TP53, and the malignant phenotype in head and neck cancer by anti-CK2 oligonucleotides in vitro or in vivo via sub-50-nm nanocapsules. **Clinical Cancer Research**, v. 16, p. 2295–2307, 2010.

BUMCROT, D. et al. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. **Nature Chemical Biology**, v. 2, p. 711–719, 2006.

CAMPOCHIARO, P. A. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. **Gene therapy**, v. 13, n. 6, p. 559–562, 2006.

CAPECCHI, M. R. Altering the Genome Homologous Recombination. **Science**, v. 244, n. 1, p. 1288–1292, 1989.

CHANG, C. M.; 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.; BODMEIER, R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, p. 747–752, 1997b.

CHANG, C. M.; 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.

CHEN, G. et al. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells : the effect of combining RNA interference with tyrosine kinase inhibitors or cetuximab. **BMC Medicine**, v. 10, n. 28, p. 1–15, 2012.

CHEN, S. et al. Combination therapy with VEGFR2 and EGFR siRNA enhances the antitumor effect of cisplatin in non-small cell lung cancer xenografts. **Oncology Reports**, v. 29, n. 1, p. 260–8, 2013.

CHO, H. J. et al. Poly-L-arginine and dextran sulfate-based nanocomplex for epidermal growth factor receptor (EGFR) siRNA delivery: its application for head and neck cancer treatment. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 1007–1019, 2012.

CHOI, E. J. et al. Targeting Epidermal Growth Factor Receptor – Associated Signaling Pathways in Non – Small Cell Lung Cancer Cells: Implication in Radiation Response. **Molecular Cancer Research**, v. 8, p. 1027–1036, 2010.

CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1160–1174, 2008.

CLARKE, P. Nonmelanoma skin cancers: Treatment options. **Australian Family Physician**, v. 41, n. 7, p. 476–480, 2012.

CONDE, J. et al. 15 years on siRNA delivery : Beyond the State-of-the-Art on inorganic nanoparticles for RNAi therapeutics. **Nano Today**, v. 10, p. 421–450, 2015.

D'ORAZIO, J. et al. UV Radiation and the Skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 12222–12248, 2013.

DAKA, A.; PEER, D. RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 1508–1521, 2012.

DAVID, S. et al. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 100–114, 2010.

DAY, C. L. et al. Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. **The Biochemical Journal**, v. 377, p. 597–605, 2004.

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

DEVINCENZO, J. et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). **Antiviral Research**, v. 77, n. 3, p. 225–231, 2008.

DEVINCENZO, J. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 107, p. 8800–8805, 2010.

EIBLMAIER, M. et al. Correlating EGFR Expression with Receptor-Binding Properties and Internalization of 64Cu-DOTA-Cetuximab in 5 Cervical Cancer Cell Lines. **Journal**

of Nuclear Medicine, v. 49, n. 9, p. 1472–1479, 2008.

ELBASHIR, S. M. et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. **Methods**, v. 26, p. 199–213, 2002.

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

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

ERNFORS, P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1397–1407, 2010.

FERGUSON, K. M. Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, p. 742–745, 2004.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. E359–E386, 2015.

FERREIRA, L. A. B. et al. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 2, p. 149–166, 2014.

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

FONG, W. K.; HANLEY, T.; BOYD, B. J. Stimuli responsive liquid crystals provide “on-demand” drug delivery in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 135, n. 3, p. 218–226, 2009.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH , neutral red , MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171–177, 2006.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5577–5591, 2012.

GARCIA-URIBE, A. et al. In Vivo Diagnosis of Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer Using Oblique Incidence Diffuse Reflectance Spectrometry. **Cancer Research**, v. 72, n. 11, p. 1–8, 2012.

GATZEMEIER, U. et al. Phase III Study of Erlotinib in Combination With Cisplatin and Gemcitabine in Advanced Non – Small-Cell Lung Cancer: The Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 12, p. 1545–1552, 2007.

GHOSN, B. et al. Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nanocarrier for small interfering RNA. **Oligonucleotides**, v. 20, n. 3, p. 163–172, 2010.

GILLERON, J. et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle – mediated siRNA delivery , intracellular trafficking and endosomal escape. **Nature Biotechnology**, v.

31, n. 7, p. 638–646, 2013.

GÜNTHER, M. et al. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 438–449, 2011.

GUO, J. et al. Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 4, p. 402–417, 2011.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. par-1, a Gene Required for Establishing Polarity in C . elegans Embryos , Encodes a Putative Ser/Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed. **Cell**, v. 81, p. 611–620, 1995.

GUZMAN-VILLANUEVA, D. et al. Formulation approaches to short interfering RNA and MicroRNA: Challenges and Implications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 11, p. 4046–4066, 2012.

HAN, H. D. et al. Chitosan hydrogel for localized gene silencing. **Cancer Biology and Therapy**, v. 11, n. 9, p. 839–845, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HATEFI, A.; AMSDEN, B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 80, p. 9–28, 2002.

HERBST, R. S. et al. Gefitinib in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Non – Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial — INTACT 2. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 5, p. 785–794, 2004.

HOLMES, K. et al. Detection of siRNA induced mRNA silencing by RT-qPCR: considerations for experimental design. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 53, p. 1–5, 2010.

HOUBEN, E.; DE PAEPE, K.; ROGIERS, V. A keratinocyte's course of life. **Skin pharmacology and physiology**, v. 20, n. 3, p. 122–32, 2007.

HSU, S. H. et al. Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor. **Nanomedicine**, v. 9, p. 1169–1180, 2013.

HUNG, C. et al. A novel siRNA validation system for functional screening and identification of effective RNAi probes in mammalian cells. v. 346, p. 707–720, 2006.

INVITROGEN CORPORATION. **Transfecting siRNA into Mammalian Cells Using Lipofectamine™ 2000**. Disponível em: <www.thermofisher.com>. Acesso em: 7 fev. 2014.

IZIDORO-TOLEDO, T. C. et al. A myosin-Va tail fragment sequesters dynein light chains leading to apoptosis in melanoma cells. **Cell death & disease**, v. 4, n. e547, p. 1–14, 2013.

JACOBSON, G. B. et al. Biodegradable nanoparticles with sustained release of functional siRNA in skin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 4261–4266, 2010.

JOHNSON, M. Loading Controls for Western Blots. **Mater Methods**, v. 2, p. 114, 2012.

JORGENSEN, R. A. et al. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 957–973, 1996.

KALINOWSKI, F. C. et al. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and Erlotinib Sensitivity in Head and Neck Cancer Cells by miR-7. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47067, 2012.

KAPOOR, M.; BURGESS, D. J. Cellular Uptake Mechanisms of Novel Anionic siRNA Lipoplexes. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 1161–1175, 2013.

KIM, S. H. W. H. W. et al. Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 129, n. 2, p. 107–116, 2008.

KIM, Y. M.; PARK, M. R.; SONG, S. C. Injectable polyplex hydrogel for localized and long-term delivery of siRNA. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 5757–5766, 2012.

KIM, Y. M.; PARK, M. R.; SONG, S. C. An injectable cell penetrable nano-polyplex hydrogel for localized siRNA delivery. **Biomaterials**, v. 34, n. 18, p. 4493–4500, 2013.

KOYNOVA, R.; TENCHOV, B.; MACDONALD, R. C. Nonlamellar Phases in Cationic Phospholipids, Relevance to Drug and Gene Delivery. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 1, p. 130–138, 2015.

KREBS, M. D.; ALSBERG, E. Localized, targeted, and sustained siRNA delivery. **Chemistry European Journal**, v. 17, n. 11, p. 3054–3062, 2011.

KREBS, M. D.; JEON, O.; ALSBERG, E. Localized and sustained delivery of silencing RNA from macroscopic biopolymer hydrogels. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 26, p. 9204–9206, 2009.

LARA, M. G.; BENTLEY, M. V. L. B.; COLLETT, J. H. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 241–250, 2005.

LARSSON, K. Cubic Lipid-Water Phases: Structures and Biomembrane Aspects. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 93, n. 21, p. 7304–7314, 1989.

LAZARETH, V. Management of non-melanoma skin cancer. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 182–194, 2013.

LEE, S. J. et al. Co-delivery of VEGF and Bcl-2 dual-targeted siRNA polymer using a single nanoparticle for synergistic anti-cancer effects in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 631–641, 2015.

LI, B. J. et al. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. **Nature Medicine**, v. 11, n. 9, p. 944–951, 2005.

LI, J. M. et al. Local arterial nanoparticle delivery of siRNA for NOX2 knockdown to prevent restenosis in an atherosclerotic rat model. **Gene Therapy**, v. 17, n. 10, p. 1279–1287, 2010.

LI, S.-D. et al. Tumor-targeted Delivery of siRNA by Self-assembled Nanoparticles. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 1, p. 163–169, 2008.

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

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 356, p. 375–386, 2011.

LINDBLOM, G.; RILFORS, L. Cubic phase and isotropic structures formed by membrane lipids-possible biological relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 988, p. 221–256, 1989.

LIU, W. et al. Quantification of siRNA using competitive qPCR. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 1, p. e4, 2009.

LIU, Z. et al. 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. **Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídicos: avaliação in vitro e in vivo de sistemas de liberação e moléculas carreadoras**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2005.

LOPES, L. B. et al. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: in vitro and in vivo skin penetration of cyclosporin A. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, p. 1332–1342, 2006a.

LOPES, L. B. et al. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of in vitro and in vivo delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 146–155, 2006b.

LOPES, L. B.; SPERETTA, F. F. F.; BENTLEY, M. V. L. B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 209–215, 2007.

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

LYNCH, T. J. et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. **The New England Journal of Medicine**, v. 35, n. 21, p. 2129–2139, 2004.

MANAKA, T. et al. Local delivery of siRNA using a biodegradable polymer application to enhance BMP-induced bone formation. **Biomaterials**, v. 32, p. 9642–9648, 2011.

MASIERO, M. et al. RNA interference: implications for cancer treatment. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 143–166, 2007.

MATSUI, K. et al. RNAi Silencing of Exogenous and Endogenous Reporter Genes Using a Macrocyclic Octaamine as a “Compact” siRNA Carrier . Studies on the Nonsilenced Residual Activity. **Bioconjugate Chem.**, v. 17, p. 132–138, 2006.

MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Micelles, Vesicles and Micro-Emulsions. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions 2**, v. 77, n. 4, p. 601–629, 1981.

MITTNACHT, U. et al. Chitosan/siRNA nanoparticles biofunctionalize nerve implants and enable neurite outgrowth. **Nano letters**, v. 10, p. 3933–9, 2010.

MOEBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Cubic phase-forming dry powders for controlled drug delivery on mucosal surfaces. **Jounal of Controlled Release**, v. 157, p. 206–215, 2012.

MORAES, M. H. DE. **Interferência na expressão de DLC2 afeta processos essenciais relacionados à umorigênetse e metástase em células de melanoma**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

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

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

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 978–986, 2010.

NAVARRO, G. et al. Phospholipid-modified polyethylenimine-based nanopreparations for siRNA-mediated gene silencing: Implications for transfection and the role of lipid components. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 411–419, 2014.

NEGRINI, R.; MEZZENGA, R. pH-Responsive Lyotropic Liquid Crystals for Controlled Drug Delivery. **Langmuir**, v. 27, n. 9, p. 5296–5303, 2011.

NELSON, C. E. et al. Sustained local delivery of siRNA from an injectable scaffold. **Biomaterials**, v. 33, n. 4, p. 1154–1161, 2012.

NGUYEN, K.; DANG, P. N.; ALSBERG, E. Functionalized, biodegradable hydrogels for control over sustained and localized siRNA delivery to incorporated and surrounding cells. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 4487–4495, 2013.

NORMANNO, N. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, p. 2–16, 2006.

NYS, K.; AGOSTINIS, P. Bcl-2 family members: Essential players in skin cancer. **Cancer Letters**, v. 320, p. 1–13, 2012.

OISHI, M. et al. Smart PEGylated Gold Nanoparticles for the Cytoplasmic Delivery of siRNA to Induce Enhanced Gene Silencing. **Chemistry Letters**, v. 35, n. 9, p. 1046–1047, 2006.

OLIVEIRA, S. et al. Molecular biology of epidermal growth factor receptor inhibition for cancer therapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 6, n. 6, p. 605–617, 2006.

OLIVEIRA, S. et al. Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1211–1217, 2007.

OLIVEIRA, S. et al. Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform. **Journal of Controlled Release**, v. 145, p. 165–175, 2010.

OVERHOFF, M.; WUNSCHE, W.; SCZAKIEL, G. Quantitative detection of siRNA and single-stranded oligonucleotides: relationship between uptake and biological activity of siRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 21, p. e170, 2004.

OZCAN, G. et al. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 89, p. 108–119, 2015.

PACKHAEUSER, C. B. et al. In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 445–455, 2004.

PACKHAEUSER, C. B.; 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. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 2, p. 131–140, 2007.

PEER, D.; LIEBERMAN, J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. **Gene Therapy**, v. 18, p. 1127–1133, 2011.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 157–165, 2008.

PHAN, S. et al. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, n. 1, p. 176–182, 2011.

PUTHALAKATH, H. et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. **Science**, v. 293, p. 1829–1832, 2001.

QIAN, Y. et al. Enhanced cytotoxic activity of cetuximab in EGFR-positive lung cancer by conjugating with gold nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 4, n. 7490, p. 1–8, 2014.

RABEN, D. et al. The Effects of Cetuximab Alone and in Combination With Radiation

and/or Chemotherapy in Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 795–805, 2005.

RAEMDONCK, K. et al. Biodegradable Dextran Nanogels for RNA Interference: Focusing on Endosomal Escape and Intracellular siRNA Delivery. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 9, p. 1406–1415, 2009.

REISCHL, D.; ZIMMER, A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 8–20, 2009.

REJMAN, J.; BRAGONZI, A.; CONESE, M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. **Molecular Therapy**, v. 12, n. 3, p. 468–474, 2005.

REJMAN, J.; CONESE, M.; HOEKSTRA, D. Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. **Journal of Liposome Research**, v. 16, n. 3, p. 237–247, 2006.

RIZWAN, S. B. et al. Liquid crystalline systems of phytantriol and glyceryl monooleate containing a hydrophilic protein: Characterisation, swelling and release kinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 4191–4204, 2009.

RUJITANAROJ, P. O. et al. Controlling fibrous capsule formation through long-term down-regulation of collagen type I (COL1A1) expression by nanofiber-mediated siRNA gene silencing. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 4513–4524, 2013.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 182–195, 2010.

SALVA, E. et al. Local Delivery of Chitosan/VEGF siRNA Nanoplexes Reduces Angiogenesis and Growth of Breast Cancer In Vivo. **Nucleic Acid Therapeutics**, v. 22, n. 1, p. 40–48, 2012.

SARETT, S. M.; NELSON, C. E.; DUVALL, C. L. Technologies for controlled, local delivery of siRNA. **Journal of Controlled Release**, v. 218, p. 94–113, 2015.

SCHERER, L. J.; ROSSI, J. J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1457–1465, 2003.

SCHIFFELERS, R. M. et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 19, p. e149, 2004.

SCHROEDER, A. et al. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 1, p. 9–21, 2010.

SEBASTIAN, S. et al. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: From expression to turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1766, p. 120–139, 2006.

SEGOVIA, N. et al. Hydrogel Doped with Nanoparticles for Local Sustained Release of siRNA in Breast Cancer. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, p. 271–280, 2015.

SELBO, P. K. et al. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 1, p. 2–12, 2010.

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

SHEN, Y. et al. A novel tumor-targeted delivery system with hydrophobized hyaluronic acid-spermine conjugates (HHSCs) for efficient receptor-mediated siRNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, p. 233–243, 2011.

SHIBATA, M. et al. Combination therapy with short interfering RNA vectors against VEGF-C and VEGF-A suppresses lymph node and lung metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. **Cancer Gene Therapy**, v. 15, p. 776–786, 2008.

SIFUENTES-ROMERO, I.; MILTON, S. L.; GARCÍA-GASCA, A. 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.

SILVA, J. A. G. DA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância**, p. 1–122, 2015.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 8–42, 2015.

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

SORKIN, A.; DUEX, J. E. Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor. **Current Protocols in Cell Biology**, v. Chapter 15, p. Unit 15.14, 2010.

TAI, W.; QIN, B.; CHENG, K. Inhibition of Breast Cancer Cell Growth and Invasiveness by Dual Silencing of HER-2 and VEGF. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 2, p. 543–556, 2010.

TAKAHASHI, Y. et al. Gene silencing in primary and metastatic tumors by small interfering RNA delivery in mice: Quantitative analysis using melanoma cells expressing firefly and sea pansy luciferases. **Journal of Controlled Release**, v. 105, p. 332–343, 2005.

TARATULA, O. et al. Multifunctional nanomedicine platform for cancer specific delivery of siRNA by superparamagnetic iron oxide nanoparticles-dendrimer complexes. **Current Drug Delivery**, v. 8, p. 59–69, 2011.

UI-TEI, K. et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 3, p. 936–948, 2004.

URIBE, P.; GONZALEZ, S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous

cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. **Pathology – Research and Practice**, v. 207, p. 337–342, 2011.

VADER, P. et al. A method for quantifying cellular uptake of fluorescently labeled siRNA. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 1, p. 106–109, 2010.

VAN DER KROL, A. R. et al. Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. **The Plant Cell**, v. 2, p. 291–299, 1990.

VERCAUTEREN, D. et al. On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: Mechanisms and methods. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 566–581, 2012.

VICENTINI, F. T. M. D. C. et al. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 16–24, 2013a.

VICENTINI, F. T. M. D. C. et al. Delivery Systems and Local Administration Routes for Therapeutic siRNA. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 4, p. 915–931, 2013b.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 227–232, 2012.

WANG, H. et al. Disruption of clathrin-dependent trafficking results in the failure of grass carp reovirus cellular entry. **Virology Journal**, v. 13, n. 25, p. 1–10, 2016.

WEECHARANGSAN, W.; OPANASOPIT, P.; LEE, R. J. In Vitro Gene Transfer Using Cationic Vectors, Electroporation and their Combination. **Anticancer Research**, v. 27, p. 309–314, 2007.

WELLS, A. EGF receptor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 637–643, 1999.

WHEELER, D. L.; DUNN, E. F.; HARARI, P. M. Understanding resistance to EGFR inhibitors—impact on future treatment strategies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 9, p. 493–507, 2010.

WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 129–138, 2009.

WIRTH, T.; PARKER, N.; YLA-HERTTUALA, S. History of gene therapy. **Gene**, v. 525, p. 162–169, 2013.

WOLFRUM, C. et al. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1149–1157, 2007.

WONG, S. Y.; PELET, J. M.; PUTNAM, D. Polymer systems for gene delivery-past, present, and future. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 799–837, 2007.

XU, C.; WANG, J. Direct delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2015.

YAGHMUR, A. et al. Characterization of bupivacaine-loaded formulations based on liquid crystalline phases and microemulsions: The effect of lipid composition. **Langmuir**, v. 28, p. 2881–2889, 2012.

YAGHMUR, A.; RAPPOLT, M.; LARSEN, S. W. In situ forming drug delivery systems based on lyotropic liquid crystalline phases: structural characterization and release properties. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 23, n. 4, p. 325–332, 2013.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. S3–S8, 2001.

YARIV, D. et al. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 2, p. 185–192, 2010.

YIN, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, p. 541–555, 2014.

ZAMORA, M. R. et al. RNA Interference Therapy in Lung Transplant Patients Infected with Respiratory Syncytial Virus. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 4, p. 531–538, 2011.

ZHANG, F. et al. Quantification of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Level and Binding Kinetics on Cell Surfaces by Surface Plasmon Resonance Imaging. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 9960−9965, 2015.

ZHANG, P. et al. A linear polyethylenimine mediated siRNA-based therapy targeting human epidermal growth factor receptor in SPC-A1 xenograft mice. **Translational Respiratory Medicine**, v. 1, n. 2, p. 1–11, 2013.

ZHOU, J. et al. Nanoparticle-Based Delivery of RNAi Therapeutics: Progress and Challenges. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 85–107, 2013.