## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Thais Fedatto Abelha

Ribeirão Preto 2012

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

### FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Thais Fedatto Abelha

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

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

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr	 	
Instituição:	 Assinatura:	
Prof. Dr	 	
Instituição:	 Assinatura:	
Prof. Dr	 	
Instituição:	 Assinatura:	

### DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Helder e Milza, que tem sido meus principais e mais importantes professores. Desde os meus primeiros passos vocês têm me acompanhado e me ensinado a caminhar e crescer na vida. Durante a minha caminhada recebi todo o incentivo para nunca desistir, apesar de muitos empecilhos, e pude sempre contar com o apoio e presença de vocês. A realização desse trabalho só foi possível devido a toda dedicação, carinho e confiança depositados em mim.

Aos meus avós, Manoel, Yone e Tuta, que sempre estiveram presentes e sempre foram pessoas que me inspiraram e deram exemplo de vida.

À minha irmã Mariana, aos meus tios e tias Marina, Stefan, Vander, Christina, Márcia, Jeferson, Cristina, Virgílio, Júnior e Bernadete e a todos os meus primos por me proporcionarem uma família excepcional, que tem amor e carinho para dar e vender.

A toda a minha família por todo apoio, dedicação, carinho e compreensão.

### AGRADECIMENTOS

À Deus Pai, Filho e Espírito Santo, porque é Ele quem faz mudar os tempos e as circunstâncias; é Ele quem dá sabedoria aos sábios e talento aos inteligentes.

A toda a minha família e amigos, pelo incentivo e apoio em todos os momentos. Vocês são imprescindíveis e muito preciosos na minha vida. Agradeço especialmente aos meus pais Helder e Milza, aos avós Manoel, Yone e Tuta e à minha irmã Mariana por toda compreensão, apoio e carinho.

À Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

Aos professores Dr. Luiz Alexandre Pedro de Freitas, Dr. Sérgio Akira Uyemura, Dra. Maria José Vieira Fonseca, Dra. Glória Emília Petto de Souza, Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, pela disponibilidade de utilização de equipamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho. Aos professores Dr. João Carlos Palazzo de Mello e Dra. Maria da Conceição Torrado Truitti por todos os conselhos e ensinamentos.

À professora Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini que prestou grande ajuda na realização e interpretação dos dados das análises de difração de raios X.

À Daniele Mano, que além da amizade, também contribuiu para a realização desse trabalho com toda a disponibilidade e carinho. O seu companheirismo esteve sempre presente, independente de estar com o pé quebrado, mesmo durante os exaustivos turnos de mais de 24 horas de trabalho. Portanto, agradeço especialmente por você nunca medir esforços para ajudar e sempre fazer isso com toda dedicação, tornando o trabalho muito mais agradável com a sua companhia.

À Érika e Cindy, agradeço tanto pelos conselhos, dicas e apoio quanto pelas conversas, confidências e incentivo, mas principalmente pela amizade e carinho que sempre foram preciosos e importantes para mim.

Às companheiras e amigas de equipe e laboratório Lívia Borgheti, Lívia Depieri, Raquel, Patrícia, Fabiana, Wanessa e Fabíola, que contribuíram durante o desenvolvimento desse trabalho com sugestões, dicas e diversas colaborações. Aos companheiros e amigos de laboratório Fernando, Josimar, Juliana, Mayara, Marina e Samantha, pela amizade e paciência.

Ao colega de pós-graduação Joel pela contribuição na realização de experimentos no microscópio confocal e ao Fernando pela contribuição na realização dos estudos de reologia.

Aos técnicos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, José Orestes e Henrique, pela dedicação e amizade.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela prestação de serviços e pela oportunidade.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e, principalmente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido.

Ao frigorífico Barra Mansa Comércio de Carnes e Derivados (Sertãozinho, SP, Brasil) pela doação dos olhos de bovinos utilizados neste trabalho e à empresa *Shandong Freda Biopharm Co. Ltd.* (Jinan, China), especialmente à Ashley, pela contribuição com as amostras de hialuranato de sódio.

'Não é o mais forte da espécie que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças'

Charles Darwin

#### RESUMO

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

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

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

### ABSTRACT

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

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

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

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Seis passos nos quais a expressão gênica eucariótica pode ser controlada.	2
Figura 2.	Mecanismo de Interferência de RNA (RNAi). O processo de RNAi consiste de um passo inicial, no qual dsRNAs são clivados em fragmentos menores representados pelo miRNA ou siRNAs, e um passo efetor, no qual essas moléculas são incorporadas no complexo proteico RISC e usados como sequências-guia para reconhecer RNAm homólogos, os quais são subsequentemente inativados ou clivados.	6
Figura 3.	A: Composição esquemática do olho. B: Organização celular da córnea	8
Figura 4.	A: Visão transversal da distribuição da lágrima. B: Esquema representando a drenagem lacrimal	10
Figura 5.	Distrofia gelatinosa em forma de gota, uma distrofia genética anterior da córnea. Ilustra a córnea completamente opaca pela presença de nódulos em forma de gota. Alguns vasos sanguíneos estão presentes no tecido opaco.	12
Figura 6.	Ilustração do comportamento de um produto termorreversível de uso oftálmico. O produto é aplicado na forma de solução a temperatura ambiente e, ao entrar em contato com a superfície	16
Figura 7.	O poloxamer 407 é composto por 95-105 unidades de óxido de etileno ( <i>a</i> ) e por 54-60 unidades de óxido de propileno ( <i>b</i> ). Com o aumento da concentração ([P]) e/ou da temperatura ( $T^a$ ) a solução de poloxamer se organiza em micelas, que formam uma estrutura ordenada na forma de gel	10
Figura 8.	A quitina é um polímero de N-acetilglicosamina, que após sofrer reação de desacetilação parcial produz a quitosana, composta pela glicosamina e N-acetilglicosamina. Durante a reação de desacetilação os grupamentos acetamido da quitina são transformados, em graus variados, nos grupos amina da quitosana.	18
Figura 9.	Ésquema representando as mesofases reversa bicontínua cúbica $(V_2)$ , hexagonal (H <sub>2</sub> ) e lamelar (Lα) exibidas pela monoleína	21
Figura 10.	Principais propriedades e estruturas químicas dos excipientes escolhidos para desenvolvimento do sistema líquido cristalino em associação com ácido hialurônico.	24
Figura 11.	Fotografia de olho bovino utilizado nos experimentos (A); dissecação da córnea com uso bisturi e pinça (B); montagem da célula de difusão (C e D)	31
Figura 12.	Organograma sumarizando todas as análises realizadas para os sistemas de liberação desenvolvidos neste estudo	37

Figura 13.	Aparência do produto termorreversível na forma de solução a 25°C (A) e na forma de gel, firmemente aderido às paredes do	0.0
Figura 14.	Viscosidade da formulação F1 em diferentes temperaturas	38 41
Figura 15.	Viscosidade da formulação F2 em diferentes temperaturas	41
Figura 16.	Comparação entre a formulação L1 e soluções de poloxamer e quitosana LMW a 25°C e 35°C.	42
Figura 17.	Comparação entre a formulação M2 e soluções de poloxamer e quitosana LMW a 25°C e 35°C	42
Figura 18.	Gráfico da tensão em função da taxa de cisalhamento a 25°C e 35°C da formulação F2	43
Figura 19.	Gráfico da tensão em função da taxa de cisalhamento a 25°C e 35°C da formulação I 1	43
Figura 20.	Gráfico da tensão em função da taxa de cisalhamento a 25°C e	лл
Figura 21.	Influência da mistura de <i>simulated tear fluid</i> (STF) na viscosidade das formulações a 35°C. As formulações foram avaliadas antes e	
Figura 22.	após a mistura com STF na proporção de 50:7 Eletroforese das formulações termorreversíveis de poloxamer e quitosana: 25 % poloxamer + 1 % quitosana LMW e 21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW com e sem siRNA. Uma	44
Figura 23.	solução aquosa de foi utilizado como controle Penetração de siRNA-FAM em córnea bovina após 6 h da aplicação tópica. Legenda: (A) tampão HEPES; (B) 20 % poloxamer + 1 % quitosana LMW; (C) solução aquosa de siRNA- FAM; (D) 20 % poloxamer + 1 % quitosana LMW contendo siRNA- FAN; (E) tampão HEPES; (F) 21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW; (G) solução aquosa de siRNA-FAM; (H) 21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW contendo siRNA-FAN; (1) Epitélio; (2) Estroma; (3) Endotélio; (4) Formulação complexada com siRNA	49 52
Figura 24.	Fotomicrografias obtidas utilizando microscopia de luz polarizada após 12 dias de manipulação (x10). (A) 10 % MO/PEI; (B) 15 %	54
Figura 25.	Fotomicrografias obtidas a partir de amostras analisadas durante 15 dias, utilizando microscopia de luz polarizada (x10). Legenda: (A) 10 % MO/PEI + tampão contendo 12 mg de NaCI; (B) 10 % MO/PEI + tampão sem NaCI; (C) 10 % MO + tampão contendo NaCI; (1; 2; 5; 7 ou 15) Indica o número de dias que a amostra foi	54
Figura 26.	analisada apos a manipulação. Ilustração do sistema líquido cristalino composto de MO e PEI antes da dispersão (A), quando é feita a observação de birrefringência das fases cristalinas em microscópio de luz polarizada e após a dispersão (B), o sistema nanométrico é complexado ao siRNA e/ou HA para caracterização da formulação	55 56

- Figura 27. Eletroforese da dispersão de cristal líquido associada ao ácido hialurônico. A dispersão de cristais líquidos de MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) foi adicionada de siRNA e hialuronato de sódio (HA) a 0,02 % e 0,06 % em diferentes ordens de adição. A heparina foi utilizada para descomplexar o siRNA dos sistemas de liberação.

v

61

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Temperatura de formação de gel de diferentes concentrações de poloxamer em associação com 1% de quitosana MMW e LMW na ausência ou presenca de NaCI	39
Tabela 2 –	Formulações termorreversíveis desenvolvidas com diferentes tipos de quitosana. Para as análises em reômetro, os sistemas de liberação F1 e F2 foram diluídos com água mimetizando a incorporação do siRNA. Os sistemas L1 e M2 foram manipulados com a concentração de poloxamer esperada após a diluição. O sistema $F_{NaCl}$ foi o único sistema que continha cloreto de sódio na sua composição	40
Tabela 3 –	Potencial zeta das formulações e soluções contendo poloxamer	16
Tabela 4 –	Osmolalidade das preparações determinadas por diferentes	40
Tabela 5 –	Osmolalidade da dispersão de cristais líquidos de MO/PEI/fase aquosa (0,6:0,012:2,4 p/p/p e 0,3:0,012:2,7 p/p/p) em associação ou não com HA; antes e após a diluição com água, mimetizando a incorporação da solução de siRNA	40 57
Tabela 6 –	Análise de potencial zeta da formulação composta de cristais líquidos de MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) em associação com siRNA e HA	58
Tabela 7 –	Análise do tamanho de partícula e polidispersividade da formulação composta de cristais líquidos de MO/PEI/fase aquosa (0.3:0.012:2.7 p/p/p) em associação com siRNA e HA	59
Tabela 8 –	Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões dos sistemas compostos de MO/PEI/fase aquosa (0.3:0.012:2.7 p/p/p) associados com 0.02% de HA e/ou com	
	siRNA	66

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dsRNA	Double stranded RNA ou RNA de fita dupla
EPM	Erro padrão médio
F1	Formulação 25 % poloxamer + 1 % quitosana LMW diluída com $H_2O$
F2	Formulação 21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW diluída com H <sub>2</sub> O
FAM	Carboxifluoresceína
F <sub>NaCl</sub>	Formulação com 18 % poloxamer + 1 % quitosana + 41 mg NaCl
HA	Ácido hialurônico ou hialuronato de sódio
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
L1	Formulação com 20 % poloxamer + 1 % quitosana LMW
LMW	Low molecular weight
M1	Formulação com 16,8 % poloxamer + 1 % quitosana MMW
MMW	Medium molecular weight
MO	Monoleína
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão fosfato/salina
PEI	Polietilenimina
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	Interferência de RNA
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small inteference RNA
siRNA-FAM	Small inteference RNA-6-carboxyfluorescein
STF	Simulated tear fluid ou lágrima artificial
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
T <sub>sol/gel</sub>	Temperatura de transição solução/gel

# 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	1
1.2. Interferência de RNA	2
1.3. Córnea: estrutura e fisiologia	7
1.4. Terapia Gênica da Córnea	10
1.5. Sistemas de liberação ocular para veicular RNAi	13
1.5.1. Gel termorreversível com quitosana	15
1.5.2. Sistema líquido cristalino em associação com ácido hialurônico	18
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS	26
4. MÉTODOS	27
4.1. Incorporação do siRNA aos sistemas de liberação desenvolvidos	27
4.2. Obtenção da formulação termorreversível	27
4.3. Caracterização da formulação termorreversível	28
4.3.1. Estudo de reologia e viscosidade	28
4.3.2. Análise da carga superficial.	28
4.3.3. Estudo de Osmolalidade do poloxamer 407	28
4 3 4 Avaliação da complexação do siRNA ao sistema de liberação	
termorreversível	29
4 4 Estudo de penetração <i>in vitro</i> das formulações termorreversíveis em	20
modelo animal	30
4.5. Obtenção das nanodispersões de cristais líquidos funcionalizadas com	00
ácido hialurônico	31
4.6. Caracterização das nanodispersões de cristais líquidos funcionalizadas	51
com ácido higlurônico	32
4 6 1 Análise nor microsconia de luz nolarizada	32
4.6.2 Avaliação da osmolalidade das dispersões de cristais líquidos	22
4.0.2. Avaliação da osmolalidade das dispersões de cristais líquidos	22
T. O. O. Analise da carga superilicia e la manino de particula	55
4.0.4. Availação da complexação do sintiva as haliodispersões de clistal líquido funcionalizado com ácido bialurônico	20
A 6 5 Anólico de difração de reiso X e beixo ângulo	23
4.0.0. Analise de dillação de latos A a balxo aliguio	34
4.7. Estudos III VIIIO EIII IIDIODIASIOS L929	30
4.7.1. Estudo de viabilidade celular das nanodispersoes de cristal liquido	05
	35

7. REFERÊNCIAS	74
6. CONCLUSÕES	72
funcionalizado com ácido hialurônico em fibroblastos L929	69
5.5.2. Estudo de transfecção celular das nanodispersões de cristal líquido	
funcionalizado com ácido hialurônico	67
5.5.1. Estudo de viabilidade celular das nanodispersões de cristal líquido	
5.5. Estudos <i>in vitro</i> em fibroblastos L929	67
5.4.6. Análise de difração de raios X a baixo ângulo	61
funcionalizado com ácido hialurônico	60
5.4.5. Avaliação da complexação do siRNA às nanodispersões de cristal líquido	
5.4.4. Análise do tamanho de partícula das dispersões de cristais líquidos	59
5.4.3. Análise da carga superficial das dispersões de cristais líquidos	58
5.4.2. Avaliação da osmolalidade das dispersões de cristais líquidos	56
5.4.1. Análise por microscopia de luz polarizada	53
ácido hialurônico	53
5.4. Obtenção e caracterização do sistema líquido cristalino funcionalizado com	
modelo animal	49
5.3. Estudo de penetração <i>in vitro</i> das formulações termorreversíveis em	10
termorreversível	49
5 2 4 Avaliação da complexação do siRNA ao sistema de liberação	
5.2.3. Estudo de Osmolalidade do poloxamer 407	46
5.2.2. Análise da carga superficial (potencial Zeta)	45
5.2.1. Estudo de reología e viscosidade	40
5.2. Caracterização da formulação termorreversível	40
5.1. Obtenção da formulação termorreversível	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
	00
funcionalizado com ácido bialurônico em fibroblastos 1.929	36
472 Estudo de transferção celular das nanodispersões de cristal líquido	

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Terapia Gênica

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

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

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

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



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

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

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

#### 1.2. Interferência de RNA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

#### 1.3. Córnea: estrutura e fisiologia

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

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

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



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

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

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

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

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



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

#### 1.4. Terapia Gênica da Córnea

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

### 1.5. Sistemas de liberação ocular para veicular RNAi

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

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

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

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

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

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

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

### 1.5.1. Gel termorreversível com quitosana

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

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

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

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



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



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

407. classificado 0 poloxamer como um tensoativo não iônico termorreversível, tem sido utilizado no desenvolvimento de formulações tópicas termorreversíveis para aplicação ocular (LIN; SUNG, 2000; WEI et al., 2002; QI et al., 2007; GRATIERI et al., 2010). Os sistemas de liberação in situ contendo este tipo de poloxamer proporcionaram maior tempo de residência após aplicação oftálmica in vivo (WEI et al., 2002; GRATIERI et al., 2010). Estudos com poloxamer 407 tiveram resultados reológicos favoráveis para o uso desse polímero em sistemas liberação (RICCI et al., 2002; EDSMAN CARLFORS; PETTERSON, 1998; GRATIERI et al., 2010) e a associação com a quitosana proporcionou características desejáveis para utilização oftálmica, como o aumento da mucoadesão da formulação (GRATIERI et al., 2010).

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

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



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

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

#### 1.5.2. Sistema líquido cristalino em associação com ácido hialurônico

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Em uma estrutura líquido cristalina de fase cúbica, as bicamadas lipídicas estão rearranjadas em uma matriz tridimensional na forma de cubos. A fase reversa bicontínua cúbica consiste em dois canais de água contínuos, que não se interceptam e são separados por uma bicamada lipídica (**Figura 9**) (ENGSTRÖM;
ENGSTRÖM, 1992; YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004; PHAN et al., 2011). Um produto composto de mesofase cúbica possui aspecto de um gel viscoso, que é estável com a variação de temperatura, e é oticamente isotrópico (HELLEDI; SCHUBERT, 2001; YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004). As estruturas mesomórficas cúbicas possuem inúmeras aplicações, entretanto, devido à dificuldade de processar e manipular um produto na forma de gel, as dispersões em menores estruturas facilitam a utilização do produto e mantém as propriedades líquido cristalinas. Portanto, os géis de forma cúbica preparados com excesso de água podem ser dispersos em nanopartículas estáveis (YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004).



**Figura 9** – Esquema representando as mesofases reversa bicontínua cúbica (V<sub>2</sub>), hexagonal (H<sub>2</sub>) e lamelar (L $\alpha$ ) exibidas pela monoleína. Adaptado de: Seddon (2010) e Phan et al. (2011).

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

#### 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar o potencial de dois sistemas de liberação, um sistema de geleificação *in situ* de poloxamer 407 em associação com dois diferentes tipos de quitosana e um sistema nanodisperso de cristais líquidos em associação com ácido hialurônico, como sistemas carreadores para aplicação oftálmica de siRNAs.

Os objetivos específicos foram:

 Desenvolver um sistema de liberação termorreversível contendo diferentes tipos de quitosana e caracterizar as formulações por análise de reologia, medida da carga superficial e osmolalidade;

- Avaliar a influência do poloxamer 407 na osmolalidade do produto termorreversível;

- Estudar a penetração *in vitro* do siRNA marcado com sonda fluorescente em córnea bovina;

- Desenvolver uma formulação composta de cristais líquidos contendo ácido hialurônico e caracterizar por microscopia de luz polarizada, difração de raios X a baixo ângulo, osmolalidade, medida da carga superficial, tamanho de partícula e polidispersividade;

Avaliar o efeito da formulação líquido cristalina contendo ácido hialurônico na viabilidade celular;

 Avaliar o potencial de utilização da formulação líquido cristalina contendo ácido hialurônico através de estudo de transfecção celular, utilizando siRNA marcado com sonda fluorescente;

 Investigar a capacidade de complexação do siRNA às formulações desenvolvidas por eletroforese;

#### 3. MATERIAL

O poloxamer 407; quitosana low molecular weight (LMW; 92.2% de molecular weight desacetilação); quitosana medium (MMW: 77,0% de desacetilação); polietilenimina (PEI) e brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio (MTT) foram comprados da Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, EUA). A monoleína (MO, Myverol 18,92K<sup>®</sup>) foi cedida pela Quest International, Inc. (Norwich, NY, EUA). O hialuranato de sódio ou sal sódico do ácido hialurônico (HA; 1070 kDa) foi doado pela Shandong Freda Biopharm Co. Ltd. (Jinan, China). Os siRNAs utilizados foram Silencer Negative Control #1 siRNA (Catálogo #AM4635) e Silencer 6-carboxyfluorescein (FAM) GAPDH siRNA (Catalogo #AM4650), ambos comprados da Ambion (Austin, TX, EUA). As córneas utilizadas foram provenientes de olhos de bovinos recém abatidos, doados pelo frigorífico Barra Mansa Comércio de Carnes e Derivados (Sertãozinho, SP, Brasil).

### 4. MÉTODOS

#### 4.1. Incorporação do siRNA aos sistemas de liberação desenvolvidos

O siRNA foi adicionado na proporção de 1:4 (siRNA:formulação) e misturado à formulação (concentração final de siRNA de 2,5 µM). A mistura final foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos para garantir a complexação da molécula pelo sistema de liberação desenvolvido. Sempre que o siRNA foi adicionado, todas as soluções utilizadas para preparar as formulações foram preparadas com água livre de RNase. Como o siRNA é incorporado na forma de solução todos os sistemas sofreram uma pequena diluição.

#### 4.2. Obtenção da formulação termorreversível

Soluções contendo diferentes concentrações de poloxamer 407 (16-25 % p/p) e/ou de quitosana (0,5; 0,8; 1,0 ou 1,5 % p/p) foram preparadas com solução de ácido acético a 0,5 % (p/v). Quando o poloxamer foi utilizado, a solução previamente preparada foi resfriada antes da incorporação do polímero e, após a dispersão, foi deixada sob refrigeração por pelo menos 24 horas para garantir a completa hidratação do polímero. O pH das formulações foi corrigido entre 5,8-6,2. A temperatura de transição solução/gel ( $T_{sol/gel}$ ) das formulações foi primeiramente verificada por uma adaptação do método de inversão de tubo descrito por Bentley et al. (1999): 2,0 g de amostra foi colocada em um recipiente de vidro com 15 mm de diâmetro externo e aquecido em banho maria de 4°C a 40°C. A  $T_{sol/gel}$  foi considerada quando, ao inverter o tubo, toda a formulação permanecesse aderida ao fundo do recipiente, e foi medida com um termômetro Incoterm (precisão de 1,0°C). As formulações com  $T_{sol/gel}$  adequadas foram analisadas em reômetro.

#### 4.3. Caracterização da formulação termorreversível

#### 4.3.1. Estudo de reologia e viscosidade

O Reômetro R/S-TPS-P1 (Brookfield Engineering, EUA) foi utilizado para as análises de reologia e viscosidade das formulações de poloxamer e quitosana. O spindle C50-1 foi utilizado; a tensão aplicada foi crescente de 10 a 100 (1/s) durante 60 segundos e decrescente de 100 a 10 (1/s) durante 60 segundos e 1,0 mL de amostra foi empregado por análise. Para confirmar a  $T_{sol/gel}$  as análises de viscosidade das formulações foram realizadas de 25°C a 35°C. As demais análises foram realizadas a 25°C e 35°C.

Para simular condições fisiológicas, lágrima artificial – simulated tear fluid (STF) – foi obtida conforme Hägerström et al. (2000), resultando em pH de 8,2 e osmolalidade de 291,3 (±3,2) mOsm/Kg. Considerando que o olho mantém um volume permanente de aproximadamente 7-10  $\mu$ L de lágrima e os batoques comerciais instilam um volume de 40-50  $\mu$ L (BAEYENS; GURNY, 1997; GAFFNEY et al., 2010; WEI et al., 2002), 50  $\mu$ L das formulações termorreversíveis foram misturadas com 7  $\mu$ L de STF para avaliar a influência dessa solução eletrolítica na T<sub>sol/gel</sub> do produto.

#### 4.3.2. Análise da carga superficial

As análises de carga superficial (potencial Zeta) foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano System ZS (Malvern Instruments, Alemanha) a 25°C. As formulações contendo poloxamer e quitosana foram diluídas na proporção de 1:1 (formulação:água) e o pH foi mantido entre 5,25 e 5,35.

#### 4.3.3. Estudo de Osmolalidade do poloxamer 407

A isotonicidade é uma característica importante para uma formulação oftálmica. A pressão osmótica é demonstrada pelo número total de espécies moleculares em solução, conforme descrito na XV Farmacopéia Japonesa. Embora,

teoricamente, considera-se que moléculas de alto peso molecular com propriedade não iônica não interferem nesta propriedade coligativa, o oposto é indicado para poloxamer (VIEGAS; HENRY, 1998). Portanto, é necessário avaliar a influência desse polímero na osmolalidade do produto desenvolvido.

Para avaliar a influência do poloxamer 407 na osmolalidade do produto, os sistemas contendo a quitosana LMW em associação com 18 e 20 % de poloxamer foram avaliados por dois métodos diferentes. Além disso, NaCl foi adicionado a uma formulação com intuito de se obter um sistema isotônico, considerando-se que o poloxamer 407 não interferiria na pressão osmótica do produto. Como uma solução de ácido acético 0,5 % (p/v) contendo 1 % de quitosana LMW e 41 mg de NaCl apresentou valor de osmolalidade desejável de 307,4 mOsm/Kg (±2,5), 41 mg de NaCl foi adicionado a uma formulação contendo 18 % de poloxamer.

A osmolalidade das formulações com e sem NaCl foi mensurada em osmômetro e comparada com valores obtidos pelo método da diluição (*Osmolarity Determination*, XV Farmacopéia Japonesa). Sucintamente, uma amostra é diluída n vezes até atingir um valor de osmolalidade (C'<sub>T</sub>) de uma solução isotônica de NaCl (0,9 g/100 mL). A osmolalidade aparente (C<sub>T</sub>) pode ser calculada pela fórmula (n).(C'<sub>T</sub>)=(C<sub>T</sub>). Todas as soluções e formulações foram avaliadas no equipamento Semi-micro osmometer K 7400 (Knauer, Alemanha) a -9°C.

## 4.3.4. Avaliação da complexação do siRNA ao sistema de liberação termorreversível

A complexação do siRNA aos sistemas desenvolvidos foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose foi preparado utilizando 2 % de agarose e tampão TAE. A mistura foi aquecida até completa solubilização da agarose e, após o resfriamento da solução, 0,01 % de brometo de etídeo (10 mg/mL) foi adicionado. A mistura foi então vertida sobre cuba eletroforética horizontal, onde permaneceu em repouso até a formação do gel.

Para as formulações serem aplicadas no gel, 30 µL das amostras foram misturadas com 8 µL de *loading buffer* (responsável por conferir densidade às amostras) e 30 µL dessa mistura final foram aplicados em cada poço. Após a aplicação das amostras no gel, a corrida foi feita em cuba horizontal utilizando

tampão Tris-Acetato-EDTA pH 8 (TAE) na potência de 100 V por 30 minutos. A leitura do gel de agarose em UV foi realizada por meio do software Quantity one.

As formulações termorreversíveis compostas de 21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW e 25 % poloxamer + 1 % quitosana LMW contendo siRNA foram avaliadas. Como controle, as mesmas formulações sem siRNA e uma solução aquosa de siRNA foram utilizadas.

## 4.4. Estudo de penetração *in vitro* das formulações termorreversíveis em modelo animal

O estudo de liberação foi realizado com siRNA marcado com sonda fluorescente carboxifluoresceína (FAM) (siRNA-FAM, excitação e emissão a 492 e 517 nm) e, ao final dos experimentos, as córneas foram avaliadas utilizando microscópio de fluorescência ou confocal, permitindo visualizar a distribuição e localização da molécula no tecido.

Os olhos de bovinos foram coletados no Frigorífico Barra Mansa e transportados sob refrigeração (aproximadamente 4°C) para o laboratório. Somente olhos sem alguma deformidade aparente foram utilizados. As córneas foram dissecadas cuidadosamente e armazenadas provisoriamente em tampão HEPES isotonizado com NaCl (pH 7,4) até serem colocadas na célula de difusão vertical (**Figura 11**). Todo o procedimento desde o abate do animal para coleta dos olhos, transporte, dissecação das córneas até a montagem das células de difusão demandou aproximadamente 1 hora, devido à localização próxima entre o frigorífico e o laboratório (10 Km).

Para montagem da célula de difusão, tampão HEPES isotonizado foi adicionado ao compartimento receptor das células de difusão; as córneas foram colocadas horizontalmente com o endotélio voltado para o compartimento receptor e o epitélio para o compartimento doador com o cuidado de não permanecerem bolhas dentro do compartimento receptor; o compartimento doador foi preso ao receptor com uma presilha sem deslocar as córneas da posição previamente fixada (**Figura 11 C e D**). O sistema foi mantido a 35°C (temperatura ocular) e agitado a 600 rpm conforme Gratieri (2010). O método utilizado no estudo de penetração *in vitro* foi previamente validado pelo grupo de pesquisa.



**Figura 11 –** Fotografia de olho bovino utilizado nos experimentos (A); dissecação da córnea com uso bisturi e pinça (B); montagem da célula de difusão (C e D).

Após a montagem das células de difusão, 100 µL das formulações complexadas com siRNA-FAM e controles (tampão HEPES, solução aquosa de siRNA-FAM e as formulações sem siRNA-FAM) foram aplicados no compartimento doador. Após seis horas de experimento, as córneas foram congeladas utilizando Tissue-Tek<sup>®</sup> (Sakura, Holanda) e seccionadas verticalmente em criostato (10 µm de espessura) para avaliação em microscópio de fluorescência modelo Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha) empregando filtro 4 (emissão de 505 a 565 nm e excitação de 480 a 520 nm). Para análise em microscópio confocal modelo TCS-SP 2 SE (Leica, Alemanha), as amostras foram verticalmente seccionadas a 20 µm de espessura e analisadas com emissão de 505 a 530 nm e excitação de 490 a 494 nm.

## 4.5. Obtenção das nanodispersões de cristais líquidos funcionalizadas com ácido hialurônico

As formulações foram obtidas com diferentes concentrações de MO (10, 15, 20 e 25%, p/p) e 0,4 % de PEI (p/p). O método de preparo foi adaptado de Lopes et

al. (2006) e Rossetti et al. (2011), em que a MO foi fundida a 42°C e misturada com PEI em agitador tipo *vortex* Ika® (2500 rpm) por 3 minutos. Como fase aquosa, tampão TRIS pH 6,5 contendo 1,5% de poloxamer 407 - adicionado ou não de 12 mg de NaCI - foi adicionado e a mistura foi deixada sob repouso por pelo menos 24 horas para a formação e estabilização da fase cristalina, que foi observada microscópio óptico com luz polarizada (**item 4.6.1**.). Após a verificação da formação da fase líquido cristalina, a preparação foi agitada em vórtex por 2 minutos e dispersa em ultrassom de haste (sonicador) por 6 minutos utilizando potência de 4,4-6,6 Watts. Uma solução de HA a 0,5 % (p/v) foi preparada com tampão TRIS e diferentes alíquotas foram utilizadas dependendo da concentração desejada do polímero na formulação. O HA na concentração de 0,02 % (JIANG et al., 2009) ou 0,06 % foi incorporado após o cristal líquido de MO/PEI ser disperso. Sempre que a solução de HA foi utilizada, a formulação foi preparada descontando-se a quantidade de fase aquosa adicionada.

## 4.6. Caracterização das nanodispersões de cristais líquidos funcionalizadas com ácido hialurônico

#### 4.6.1. Análise por microscopia de luz polarizada

A utilização do microscópio de luz polarizada é uma técnica comumente empregada para observar a presença de birrefringência em cristais líquidos que apresentam anisotropia. Portanto, formulações contendo 10 a 25 % de MO foram avaliada por três vezes distintas durante 12 dias. Já a formulação contendo 10 % de MO, manipulada com a fase aquosa contendo ou não NaCl, foi avaliada durante 15 dias. A formação da fase cristalina foi observada em microscópio óptico modelo Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com filtro polarizador e acoplado à câmera digital Axiocan HRc (Carl Zeiss AG, Alemanha) com sistema de vídeo e aquisição automática de imagem.

#### 4.6.2. Avaliação da osmolalidade das dispersões de cristais líquidos

A osmolalidade da dispersão de cristais líquidos foi avaliada medindo a formulação diretamente em osmômetro e após a sua diluição com água na mesma proporção da incorporação do siRNA. Os sistemas de liberação contendo 10 e 20 % de MO, preparados com a fase aquosa adicionada ou não de 12 mg de NaCl foram avaliados. A formulação contendo 10 % de MO foi associada a 0,02 e 0,06 % de HA para avaliar a influência da incorporação da solução de HA. Todas as soluções e formulações foram avaliadas no equipamento Semi-micro osmometer K 7400 (Knauer, Alemanha) a -9°C.

#### 4.6.3. Análise da carga superficial e tamanho de partícula

As análises de potencial zeta e tamanho de partícula da nanodispersão de cristais líquidos foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano System ZS (Malvern Instruments, Alemanha) a 25°C. As dispersões de cristal líquido foram diluídas na proporção de 1:16,7 (formulação:água) para as análises de carga superficial e 1:100 (formulação:água) para a análise de tamanho de partícula. Na análise de tamanho de partícula, o resultado da distribuição das nanopartículas foi obtido através de gráficos de porcentagem de intensidade.

## 4.6.4. Avaliação da complexação do siRNA às nanodispersões de cristal líquido funcionalizado com ácido hialurônico

O estudo foi realizado conforme o **item 4.3.4.** e, além da capacidade de complexar o siRNA, a dispersão de cristais líquidos foi avaliada com relação à estabilidade do siRNA após a incorporação. Para tanto, uma solução de heparina foi utilizada para descomplexar o siRNA da formulação (XIONG; ULUDAG; LAVASANIFAR, 2009; SHEN et al., 2011).

O siRNA foi adicionado às dispersões de cristais líquido funcionalizadas ou não com o HA para avaliação da capacidade de complexação. Como controle, as mesmas formulações sem siRNA e uma solução aquosa de siRNA foram utilizadas.

Para avaliar a estabilidade do siRNA na formulação, o sistema de liberação já complexado com siRNA foi incubado com 30 % solução de heparina sódica (5000 Ul/mL) e mantido em banho termostatizado a 37°C por 1 hora (XIONG; ULUDAG; LAVASANIFAR, 2009; SHEN et al., 2011). Como controle, uma solução de heparina misturada com HA e/ou siRNA foi utilizada.

#### 4.6.5. Análise de difração de raios X a baixo ângulo

As dispersões de cristais líquidos foram analisadas no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (Campinas, SP, Brasil) com a colaboração da Profa. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini, utilizando o equipamento D02A-SAXS2 (*Small Angle X-Ray Beamline*). As medidas do ângulo de espalhamento 20 foram realizadas utilizando  $\lambda$ = 0,1608 nm. 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. As intensidades foram registradas em um detector bidimensional, por um período de 900 segundos. 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.

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

A formulação contendo MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) foi manipulada e dispersa em sonicador 1, 2, 7 ou 15 dias após a manipulação. O sistema disperso, quando não adicionado de siRNA, foi diluído com água livre de RNase na mesma proporção. A amostra dispersa 2 dias após a manipulação foi complexada durante 30 minutos com 0,02 % de HA e/ou o siRNA.

#### 4.7. Estudos *in vitro* em fibroblastos L929

As células L929 são utilizadas como modelo padrão de expressão do receptor CD44 para o ácido hialurônico (WIRANOWSKA et al., 2010), por isso foram utilizadas no presente estudo.

As células de fibroblastos de camundongos da linhagem L929 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 1 % (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico composto por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL e 10 % (v/v) de soro bovino fetal inativado (meio DMEM completo). Foram incubadas a 37°C com 5 % de CO<sub>2</sub>. As células foram sub-cultivadas a cada 5-7 dias, usando solução salina 0,9 % com 1 % (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico para lavá-las e tripsina 0,25 % para desagregá-las do frasco. Após desagregação, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C, ressuspendidas em meio DMEM completo e, para contagem de células, usou-se câmara de Neubauer.

## 4.7.1. Estudo de viabilidade celular das nanodispersões de cristal líquido funcionalizado com ácido hialurônico

O ensaio de viabilidade celular permite avaliar o potencial e a proporção de morte celular causada pela aplicação de tratamentos específicos. A viabilidade da linhagem celular frente a dispersão foi determinada empregando brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 0,5x10<sup>5</sup> células/poço. Após a confluência, normalmente 24 horas, as células foram tratadas com 20 µL da dispersão (diluída 1:50 em tampão PBS pH 7,2). As células foram então incubadas por 24 horas em meio incompleto (meio DMEM sem soro bovino fetal). Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina 0,9 % (contendo 1 % (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico). Meio incompleto foi adicionado, juntamente com 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL). Após incubação por 4 horas, o meio de cultura foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados. O MTT é reduzido em cristais de formazan pelas células viáveis, os quais são medidos colorimetricamente no

comprimento de onda de 570 nm utilizando leitor de placa de Elisa (µQuant, Biotek Instruments Inc.) (SCHERLIESS, 2011). A viabilidade celular de cada grupo foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle (células sem contato com a dispersão), sendo considerado como 100 % de viabilidade celular.

A formulação contendo MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) foi dispersa em ultrassom de haste; 40 µL do sistema disperso foi complexado com 0,02 % e 0,06 % de HA por 30 minutos; em seguida foi adicionado 10 µL de água. Para avaliar a influência do HA na ação da formulação, a dispersão sem a incorporação do HA também foi avaliada. Uma solução contendo 0,4 % de PEI associada ou não a 0,02 % e 0,06 % de HA também foram testadas na mesma proporção utilizada nos sistemas de liberação. Como controle, meio de cultura foi aplicado no lugar das formulações.

Os dados obtidos das diferentes concentrações das amostras foram avaliados por análise de variância (ANOVA unifatorial) seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi:  $p < 0,05 \rightarrow *$ ;  $p < 0,01 \rightarrow **$ ;  $p < 0,001 \rightarrow ***$ . Os resultados foram expressos graficamente (GraphPad Software Prisma, versão 3.0, San Diego California, EUA), a partir dos valores absolutos, como porcentagem média em relação ao controle ± erro padrão da média (EPM), com intervalo de confiança de 95 %.

## 4.7.2. Estudo de transfecção celular das nanodispersões de cristal líquido funcionalizado com ácido hialurônico em fibroblastos L929

Para o estudo de transfecção celular, os fibroblastos L929 foram colocados em placas na densidade de 1x10<sup>6</sup> células/poço; 20 µL das formulações e controles foram diluídos em 980 µL de PBS e 200 µL desta solução foram misturadas com 1,8 mL de meio incompleto para serem aplicados nos poços. Os sistemas foram incubados por 24 horas e, então, o meio de cultura contendo as formulações e controles foi retirado, as células foram lavadas com salina e 2 mL de meio incompleto foi acrescentado. Por fim, as amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência modelo Imager A1 utilizando filtro 4 (Carl Zeiss, Alemanha).

A formulação contendo MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) foi dispersa em ultrassom de haste; 20 µL do sistema disperso foi complexado com 0,02 % e 0,06 % de HA por 30 minutos; em seguida foi complexada com 4 µL de siRNA-FAM por 30 minutos. Para avaliar a influência do HA na ação da formulação, o mesmo sistema líquido cristalino disperso foi complexado somente com siRNA-FAM, conforme descrito anteriormente. Uma solução contendo 0,4 % de PEI associada ou não a 0,06 % de HA também foram complexadas ao siRNA-FAM, na mesma proporção utilizada nos sistemas de liberação. Como controle, os sistemas e soluções na presença ou ausência do HA foram utilizados sem a adição de siRNA-FAM.

A Figura 12 sumariza as caracterizações dos dois sistemas estudados.



Figura 12: Organograma sumarizando todas as análises realizadas para os sistemas de liberação desenvolvidos neste estudo.

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Obtenção da formulação termorreversível

De acordo com Dumortier e colaboradores (2006) a  $T_{sol/gel}$  do poloxamer pode ser influenciada por diferentes excipientes presentes na formulação. Portanto, a alteração da  $T_{sol/gel}$  de soluções de poloxamer quando associados com quitosana e/ou NaCl foi avaliada pelo método de inversão do tubo (**Figura 13**). O método de inversão tubo é um método comumente utilizado para descrever a  $T_{sol/gel}$  de géis termorreversíveis, de fácil execução, e embora não muito sensível, pode demonstrar alterações significativas na  $T_{sol/gel}$  do sistema desenvolvido, permitindo a triagem de formulações (BENTLEY et al., 1999; TAKEUCHI et al., 2003; SHIMOKAWA et al., 2009).



**Figura 13** – Aparência do produto termorreversível na forma de solução a 25°C (A) e na forma de gel, firmemente aderido às paredes do recipiente, entre 25-35°C (B).

A T<sub>sol/gel</sub> ideal é entre 25°C e 35°C (GRATIERI et al., 2010). Soluções de poloxamer 407 em diferentes concentrações foram avaliadas e a que continha 17 % deste polímero (**Tabela 1**) proporcionou valor aceitável de temperatura de formação de gel. Com adição de 1 % de quitosana MMW não houve influencia na T<sub>sol/gel</sub> do poloxamer. Entretanto, quando 1 % de quitosana LMW foi acrescentado à formulação, a T<sub>sol/gel</sub> aumentou e somente com 20 % de poloxamer a temperatura de geleificação desejável foi atingida. O distinto comportamento entre as amostras de quitosana avaliadas pode estar relacionado com os diferentes graus de desacetilação e pesos moleculares das quitosanas utilizadas.

Quando 41 mg de NaCl foi adicionado à formulação contendo 20 % de poloxamer, a T<sub>sol/gel</sub> foi novamente alterada e a concentração de poloxamer precisou ser reduzida para 18 %. Isto pode ser explicado, pois um aumento na força iônica de um produto diminui a quantidade de água disponível para interação com polímero, assim a presença de NaCl diminui a temperatura de formação de gel (RICCI et al., 2002). Além disso, a influência do NaCl na T<sub>sol/gel</sub> do poloxamer já foi observada de forma dependente da concentração empregada e dos demais aditivos presentes na formulação (YONG et al., 2001).

**Tabela 1** – Temperatura de formação de gel de diferentes concentrações de poloxamer em associação com 1% de quitosana MMW e LMW na ausência ou presença de NaCI.

Concentrações de	Temperatura de geleificação das amostras analisadas			
poloxamer 407 (% p/v)	Sem quitosana	Quitosana LMW 1%	Quitosana LMW 1% 41mg NaCl	Quitosana MMW 1%
16	35,3 ± 2,5°C	>40°C	đ	.=
17	30,3 ± 0,6°C	>40°C	- 1	30,7 ± 0,6°C
18	27,0 ± 0,0°C	>40°C	32,0 ± 0,0°C	25,7 ± 0,6°C
19	24,7 ± 0,6°C	>40°C	-	<del>e</del>
20	23,3 ± 0,6°C	32,3 ± 0,6°C	22,3 ± 0,6°C	-
22	. <del></del> .	24,3 ± 0,6°C		. <del></del>
25	-	19,7 ± 0,6°C	-	-

O estudo pelo método de inversão do tubo não só permitiu observar a influência da quitosana LMW e do NaCl na temperatura de formação de gel, como também levou à identificação das formulações com temperatura de transição de solução para gel ideal, as quais foram avaliadas posteriormente em reômetro.

#### 5.2. Caracterização das formulações termorreversíveis

#### 5.2.1. Estudo de reologia e viscosidade

Diferentes sistemas de liberação foram avaliados em reômetro (Tabela 2). Conforme avaliado pelo método de inversão do tubo, as formulações com 20 % de poloxamer + 1 % de guitosana LMW e 17 % de poloxamer + 1 % de guitosana MMW demonstraram parâmetros adequados de T<sub>sol/nel</sub>. Entretanto, após a adição do siRNA em solução, essas formulações seriam diluídas e resultariam em uma concentração final de quitosana de 0,8 % e de poloxamer de 16 % e 13,6 %, respectivamente, portanto a formação de gel in situ ficaria comprometida. Isso foi confirmado após diluição dessas formulações com água e avaliação em reômetro. Portanto, formulações com maiores concentrações de poloxamer foram preparadas para que, após a diluição pela adição do siRNA em solução aguosa, ainda formassem gel in situ. As formulações F1 e F2, após diluição proporcionariam sistemas com 20 % e com 16,8 % de poloxamer, respectivamente. Portanto, para serem analisadas em reômetro, as formulações F1 e F2 foram diluídas com água mimetizando a incorporação do siRNA. Já as formulações L1 e M2, manipuladas com a concentração esperada de poloxamer após a diluição, foram analisadas sem diluição. O sistema F<sub>NaCl</sub> também foi analisado sem diluição com água.

**Tabela 2** – Formulações termorreversíveis desenvolvidas com diferentes tipos de quitosana. Para as análises em reômetro, os sistemas de liberação F1 e F2 foram diluídos com água mimetizando a incorporação do siRNA. Os sistemas L1 e M2 foram manipulados com a concentração de poloxamer esperada após a diluição. O sistema F<sub>NaCl</sub> foi o único sistema que continha cloreto de sódio na sua composição.

Quitosana	Formulação	Denominação	
LMW	25 % poloxamer + 1 % quitosana + H <sub>2</sub> O	F1	
92,2 %	20 % poloxamer + 1 % quitosana	L1	
desacetilação	18 % poloxamer + 1 % quitosana + 41 mg NaCl	F <sub>NaCl</sub>	
MMW	21 % poloxamer + 1 % quitosana + H <sub>2</sub> O	F2	
77 % desacetilação	16,8 % poloxamer + 1 % quitosana	M2	

A análise da viscosidade da formulação F1 em diferentes temperaturas, não demonstrou uma fase de solução e outra de gel entre 25°C e 35°C e devido aos

altos valores de viscosidade encontrados pode-se concluir que permaneceu na forma de gel nas condições do experimento (**Figura 14**). Com relação à formulação F2 pôde-se observar que a 25°C o produto apresentou baixa viscosidade, que aumentou progressivamente e acima de 30°C a viscosidade é a mesma (**Figura 15**). Isso indica que há uma fase de transição de solução para gel e a T<sub>sol/gel</sub> pode ser considerada 30°C.



Figura 14 – Viscosidade da formulação F1 em diferentes temperaturas.



Figura 15 – Viscosidade da formulação F2 em diferentes temperaturas.

Para investigar o efeito da quitosana LMW no comportamento reológico do sistema, a formulação L1, que continha a concentração esperada de poloxamer após a diluição, foi avaliada em reômetro de 25°C a 35°C. Foi observada baixa viscosidade a 25°C e T<sub>sol/gel</sub> de 29°C. A **Figura 16** mostra que a 35°C a formulação L1 e a solução de 20 % de poloxamer encontravam-se na forma de gel. A 25°C a solução contendo 20 % de poloxamer apresentou-se no estado de gel, entretanto a associação apresentou maior valor de T<sub>sol/gel</sub> e encontra-se na forma de solução a 25°C. Portanto, a quitosana LMW reduziu a viscosidade da formulação a 25°C e aumentou a temperatura de transição para gel. Já a quitosana MMW não demonstrou influência na formação do gel, uma vez que a 35°C a formulação M2 e a solução com 16,8 % poloxamer apresentaram os mesmos valores de viscosidade e, a 25°C, ambas exibiram valores baixos de viscosidade (**Figura 17**).



Figura 16 – Comparação entre a formulação L1 e soluções de poloxamer e quitosana LMW a 25°C e 35°C.

#### Influência da quitosana MMW na formação do gei



**Figura 17** – Comparação a formulação M2 e soluções de poloxamer e quitosana MMW a 25°C e 35°C.

A influência do tipo de quitosana utilizada no sistema de liberação termorreversível pôde ser observada pelo método de inversão do tubo e foi confirmada pelas análises de reologia. Todas as análises demonstram que somente a quitosana LMW influencia a T<sub>sol/gel</sub> do poloxamer.

A **Figura 18** ilustra que a formulação F2 exibiu comportamento de fluido newtoniano a 25°C e não newtoniano a 35°C. Neste caso, como a curva descendente é deslocada para a direita em relação à curva ascendente, o produto foi classificado como um fluido pseudoplástico a 35°C. O reograma da formulação L1 também apresentou comportamento pseudoplástico a 35°C (**Figura 19**). O comportamento pseudoplástico exibido nos reogramas das formulações é uma característica favorável, considerando que facilita o piscar, deixando uma formulação de alta viscosidade mais tolerante. Além disso, as lágrimas exibem comportamento pseudoplástico e pressupõe-se que essa característica não deva ser muito influenciada (NANJAWADE et al., 2007). Apesar da quitosana LMW influenciara a  $T_{sol/gel}$  do poloxamer, nenhumas das quitosanas avaliadas influenciaram a propriedades de fluxo e deformação do gel de poloxamer.



**Figura 18** – Gráfico da tensão em função da taxa de cisalhamento a 25°C e 35°C da formulação F2.



**Figura 19** – Gráfico da tensão em função da taxa de cisalhamento a 25°C e 35°C da formulação L1.

O contrário pode ser observado na **Figura 20** em que o reograma da formulação  $F_{NaCl}$  foi o único que demonstrou comportamento dilatante a 35°C. Apesar desta formulação só ter sido utilizada para o estudo de osmolalidade, este fato ressalta que além dos excipientes alterarem a  $T_{sol/gel}$  do poloxamer, podem também influenciar o comportamento de fluxo e de deformação do produto desenvolvido. O comportamento reológico e a  $T_{sol/gel}$  de géis de poloxamer 407 é influenciado pela presença de excipientes e o NaCl influencia as características físico-químicas de géis de poloxamer (RICCI et al., 2002).



**Figura 20** – Gráfico da tensão em função da taxa de cisalhamento a 25°C e 35°C da formulação F<sub>Nacl</sub>.



**Figura 21** – Influência da mistura de *simulated tear fluid* (STF) na viscosidade das formulações a 35°C. As formulações foram avaliadas antes e após a mistura com STF na proporção de 50:7.

Para simular condições fisiológicas, em que as formulações estariam na presença de lágrima, estas foram diluídas em STF para verificar a T<sub>sol/gel</sub> dos sistemas após a diluição. A viscosidade de todas as formulações após a mistura com

44

STF foi reduzida (**Figura 21**). Somente a formulação F1 manteve valores de viscosidade semelhantes às formulações com F2 e L1 sem estarem misturadas ao STF. A formulação F1 possui alta viscosidade e, mesmo após a diluição, ainda permaneceu na forma de gel na temperatura analisada. Isto sugere que somente um gel com elevada viscosidade resistiria ao processo de diluição da lágrima e permaneceria na forma de gel. Entretanto, *in vivo* espera-se algo intermediário entre a formação imediata do gel após aplicação e a diluição completa da formulação antes da transição para gel (GRATIERI et al., 2010). Para produtos oftálmicos termorreversíveis, o efeito da diluição com STF é habitualmente avaliado (WEI et al., 2002; QI et al., 2007) e, especificamente para a associação de poloxamer e quitosana (GRATIERI et al., 2010), a alteração na T<sub>sol/gel</sub> após diluição com STF também foi observada.

#### 5.2.2. Análise da carga superficial

Além de propriedades adequadas de comportamento de fluxo, deformação e temperatura adequada de transição para gel, a carga superficial dos produtos desenvolvidos é uma característica importante para veicular siRNA (MEADE; DOWDY, 2007). Soluções de poloxamer, quitosana LMW e MMW e associações em diferentes concentrações foram investigadas com relação ao potencial zeta.

Apesar do poloxamer 407 ser uma molécula não iônica, as soluções de 16,8 % e 20 % poloxamer apresentaram residual positivo próximo de +6,56 e +6,45, respectivamente. O potencial zeta dessas amostras atingiu valor residual positivo, provavelmente devido à faixa de pH utilizada (5,25-5,35), pois uma solução de 20 % de poloxamer com pH de 5,85 apresentou residual próximo de zero (+0,48 (±0,04)). Com relação às variedades de quitosana utilizadas, a quitosana MMW com 77,0 % de desacetilação apresentou maior carga positiva do que a quitosana LMW com 92,2 %. Apesar de possuir menor grau de desacetilação, o maior peso molecular pode ter contribuído para os valores encontrados (**Tabela 3**).

As soluções de quitosana MMW e LMW apresentaram elevada carga positiva de forma proporcional às concentrações testadas. Nas associações de quitosana e poloxamer a carga demonstrada pelos diferentes tipos de quitosana reduziu, mas as formulações continuaram com carga residual positiva. A associação do poloxamer com 0,5 %, 1 % ou 1,5 % de quitosana resultou em valores similares de residual positivo, sendo que a menor concentração resultou em valores pouco inferiores. As formulações F1 e F2 resultaram em valores de potencial zeta próximos às formulações com 16,8 % e 20 % de poloxamer, respectivamente, associadas com 1 % ou 1,5 % de quitosana (**Tabela 3**).

**Tabela 3** – Potencial zeta das formulações e soluções contendo poloxamer e/ou quitosana. Diluição das amostras de 1:1 e pH entre 5,25-5,35.

Amostra	Potencial Zeta (mV)
0,5 % quitosana MMW	+53,03 (±0,81)
0,8 % quitosana MMW	+69,73 (±1,85)
1 % quitosana MMW	+74,97 (±2,93)
1,5 % quitosana MMW	+80,73 (±2,08)
16,8 % poloxamer	+6,56 (±1,39)
16,8 % poloxamer + 0,5% quitosana MMW	+20,77 (±6,21)
16,8 % poloxamer + 1% quitosana MMW (M2)	+29,10 (±2,65)
16,8 % poloxamer + 1,5% quitosana MMW	+29,40 (±3,44)
F2	+27,80 (±3,99)
0,5 % quitosana LMW	+42,03 (±1,55)
0,8 % quitosana LMW	+48,93 (±1,42)
1 % quitosana LMW	+53,00 (±2,62)
1,5 % quitosana LMW	+64,17 (±1,70)
20 % poloxamer	+6,41 (±1,92)
20 % poloxamer + 0,5 % quitosana LMW	+15,30 (±1,08)
20 % poloxamer + 1 % quitosana LMW (L1)	+19,87 (±2,95)
20 % poloxamer + 1,5 % quitosana LMW	+21,37 (±1,91)
F1	+20,57 (±3,29)

Os valores de potencial zeta positivo encontrados para as associações de poloxamer e quitosana foram similares àqueles encontrados em nanopartículas de quitosana e copolímero de ácido lático e glicólico (PLGA) com objetivo de veicular RNAi (TAETZ et al., 2009). O residual de carga positivo encontrado nos sistemas foi satisfatório, pois pode proporcionar boa interação eletrostática com o siRNA e com a mucosa ocular.

### 5.2.3. Estudo de Osmolalidade do poloxamer 407

São escassas as informações da literatura quanto ao padrão de osmolalidade das formulações destinadas à via ocular e tal limitação de informações se estende

ao comportamento osmótico do poloxamer, apesar deste sua ampla utilização. Além disso, o emprego de diferentes tipos de poloxamer tem sido proposto para reduzir o inchaço de córneas humanas armazenadas para transplante, visto que este polímero apresentou capacidade de exercer pressão osmótica para extrair o excesso de água acumulado nesse tecido (ZHAO et al., 2008). Portanto, a osmolalidade das formulações contendo poloxamer 407 foi estudada. Como a osmolalidade de soluções contendo elevada concentração de poloxamer são difíceis de mensurar pelo método de abaixamento crioscópico, o método da diluição é utilizado para análise de osmolalidade de formulações termorreversíveis contendo poloxamer (DELLAMARY et al., 2010). A osmolalidade pôde ser medida em osmômetro sem a diluição das amostras, mas mesmo assim, as amostras foram avaliadas por ambos os métodos. Assim, dois métodos foram utilizados para avaliar o comportamento osmótico do poloxamer 407. Além disso, a formulação com NaCI foi preparada considerando que o poloxamer, por ser um polímero não iônico de alto peso molecular, teria uma influência irrelevante na osmolalidade do produto.

As amostras avaliadas pelo método da diluição foram diluídas com água em diferentes proporções até que um valor próximo a 285 mOsm/Kg fosse obtido. A formulação com 18 % poloxamer + 1 % quitosana + 41 mg de NaCl, diluída 1,67 vezes, proporcionou valor de osmolalidade de 284,6 (±0,7) mOsm/Kg e a formulação com 20 % poloxamer + 1 % quitosana, diluída 1,25 vezes, proporcionou valor de osmolalidade de 285,7 (±8,02) mOsm/Kg. Então, os valores de osmolalidade foram calculados e estão discriminados na **Tabela 4**.

As amostras analisadas pelo método da diluição tiveram valores de osmolalidade menores do que as amostras mensuradas diretamente no osmômetro. Os valores obtidos por ambos os métodos, de todas as formulações que continham poloxamer, estavam acima dos valores aceitáveis de isotonia e a formulação contendo NaCI ( $F_{NaCI}$ ) apresentou maior valor de osmolalidade. Também é possível observar que a solução com 18 % de poloxamer já apresenta elevado valor de osmolalidade. Quando o poloxamer e a quitosana foram misturados o valor de osmolalidade reduziu ao invés dos valores individuais se somarem. A osmolalidade das formulações desenvolvidas com os diferentes tipos de quitosana para aplicação de siRNA (F1 e F2) foi mensurada diretamente em osmômetro, sendo que os valores encontrados foram elevados (**Tabela 4**).

<b>bela 4</b> – Osmolalidade das preparações determinadas por diferentes metodos			
Amostra	Osmolalidade		
Amoodu	(mOsm/Kg)		
Osmolalidade obtida pelo cálculo da dilu	ição		
18 % poloxamer + 1 % quitosana LMW + 41 mg NaCl	475,3		
20 % poloxamer + 1 % quitosana LMW	357,1		
Osmolalidade mensurada diretamente em osmômetro			
1 % quitosana LMW	51,7 (±1,2)		
1 % quitosana LMW + 41 mg NaCl	307,4 (±2,5)		
18 % poloxamer	399,0 (±4,6)		
18 % poloxamer + 1 % quitosana LMW	360,7 (±3,5)		
18 % poloxamer + 1 %quitosana LMW + 41 mg NaCl	655,7 (±2,9)		
20 % poloxamer + 1 % quitosana LMW	431,7 (±11,9)		
Osmolalidade mensurada diretamente em osmômetro das			
formulações diluídas com água na mesma proporção da adição da			
solução de siRNA			

	<b>Fabela 4 –</b> Osmolalidade das	preparações determinadas	por diferentes métodos
--	------------------------------------	--------------------------	------------------------

21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW (F2)	413,7 (±5,0)
25 % poloxamer + 1 % quitosana LMW (F1)	683,3 (±9,1)

Embora o poloxamer seja um tensoativo não iônico, o polímero apresentou grande influência na osmolalidade do produto e essa característica deve ser considerada durante o desenvolvimento de formulações para aplicação oftálmica. As formulações analisadas apresentaram elevados valores de osmolalidade, portanto há necessidade de realizar mais estudos para avaliar a possível ocorrência de efeitos adversos à córnea pelo uso das mesmas.

Comparando-se os métodos empregados, atribui-se as diferenças de valores de osmolalidade obtidas entre a medida direta da osmolalidade e o método da diluição ao erro inerente à própria diluição da formulação e pelo método da diluição proporcionar um valor de osmolalidade aparente obtido por cálculo. Assim, considera-se que os valores mensurados diretamente em osmômetro são mais válidos para representar a osmolalidade dos sistemas de liberação desenvolvidos.

# 5.2.4. Avaliação da complexação do siRNA ao sistema de liberação termorreversível

A eletroforese de formulações desenvolvidas para aplicação da terapia gênica é comumente realizada para detectar a formação de complexos entre as formulações e os genes (FUENTE et al., 2008a; XIONG; ULUDAG; LAVASANIFAR, 2009; SHEN at al., 2011; ZHANG et al, 2012). Esta técnica é baseada no desaparecimento da banda correspondente à banda do siRNA livre (XIONG; ULUDAG; LAVASANIFAR, 2009; SHEN at al., 2011).

A complexação do siRNA viabiliza a sua aplicação por protegê-lo frente a degradação enzimática e também por promover a absorção celular e a liberação no citoplasma das células (SHEN et al., 2011). A eletroforese das formulações desenvolvidas demonstrou a capacidade das mesmas em complexar o siRNA, pois somente a banda do siRNA livre foi visualizada (**Figura 22**). Assim, pode-se dizer que o siRNA foi complexado ao sistema e, portanto, estaria protegido da degradação enzimática e, como interagiu com os sistemas desenvolvidos, espera-se que a associação favoreça a entrada do mesmo nas células.

siRNA	25%P 1%QLMW siRNA	21%P 1%QMMW siRNA	25%P 1%QLMW	21%P 1%QMMW

**Figura 22** – Eletroforese das formulações termorreversíveis de poloxamer e quitosana: 25 % poloxamer + 1 % quitosana LMW e 21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW com e sem siRNA. Uma solução aquosa de siRNA foi utilizada como controle.

## 5.3. Estudo de penetração *in vitro* das formulações termorreversíveis em modelo animal

O estudo de penetração *in vitro* de formulações de aplicação tópica é um importante método de avaliação do desempenho do produto. Este método também é

utilizado para relacionar o efeito da atividade *in vitro* e *in vivo* de uma formulação, portanto é uma ferramenta importante no desenvolvimento e no controle de qualidade de produtos farmacêuticos (BAERT et al., 2010). Estudos de penetração *in vitro* geralmente são realizados com córnea obtida de animais confinados em abatedouros locais, que são dissecadas e montadas em um sistema de difusão (REICHL; BEDNARZ; MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Dentre as espécies animais disponíveis, a córnea bovina é utilizada como modelo em estudos *in vitro* de penetração e também para avaliação do potencial irritante de formulações (TEGTMEYER; PAPANTONIOU; MÜLLER-GOYMANN, 2001; COOPER et al., 2001; UBELS et al., 2004). Apesar da córnea porcina possuir maior similaridade com relação à espessura e ao número de camada de células epiteliais (Van den BERGHE; GUILLET; COMPAN; 2005), no presente estudo, a córnea bovina foi utilizada como modelo animal, devido à facilidade de obtenção do material, pois a remoção do globo ocular é um procedimento operacional padrão após o abate de bovinos e a localização próxima do abatedouro, como já comentado, tornou viável este tipo de estudo, pois o experimento de penetração em córnea é realizado com o tecido *ex vivo* (VALLS et al., 2008).

O uso da córnea obtida de animais recém abatidos é importante, pois no tecido vivo a estrutura de todas as camadas é mantida e a presença dos desmossomos é um fator determinante para o transporte através do epitélio. Além dos desmossomos unirem as células epiteliais, formando uma barreira de células justapostas, eles restringem a difusão de moléculas (ROJANASAKUL; ROBINSON, 1991), portanto, o tecido viável e íntegro deve ser utilizado para uma avaliação eficaz e confiável. Para realizar este experimento, o tampão HEPES isotonizado foi utilizado no meio receptor, pois ele mantém a capacidade de tamponamento na ausência de fornecimento de CO<sub>2</sub>, garantindo a estabilidade do pH (LELONG; REBEL, 1998; NEGRETE; LING; LYDDIATT, 2008; LUO et al., 2010). Além disso, o tampão HEPES foi utilizado em estudo de penetração em córnea *in vitro* durante o mesmo período de tempo utilizado neste experimento (GRATIERI, 2010).

O estudo de penetração em córnea bovina foi realizado em célula de difusão em um período de seis horas, após a aplicação das formulações. Sistemas de liberação contendo os dois tipos de quitosana estudados foram avaliados (quitosana LMW, com 92,2 % de desacetilação e quitosana MMW, com 77 % de desacetilação), com intuito de avaliar se as diferentes quitosanas estudadas teriam a mesma eficácia em promover a penetração do siRNA-FAM. Apesar da quitosana LMW influenciar a temperatura de formação de gel do poloxamer e, no sistema desenvolvido, não proporcionar características ideais como sistema de liberação termorreversível, a capacidade de penetração do sistema contento 20 % de poloxamer + 1 % de quitosana LMW foi estudada. A formulação com 21 % de poloxamer e 1 % quitosana MMW também foi avaliada. A **Figura 23** ilustra os resultados obtidos em microscópio de Fluorescência (**A-D**) e em microscópio Confocal (**E-H**).

A formulação com 20 % poloxamer e 1 % quitosana LMW foi avaliada em microscópio de fluorescência e não foi observada penetração do siRNA-FAM (**Figura 23D**). Como o filtro disponível nesse equipamento possui faixa ampla de emissão e a córnea apresenta autofluorescência, a formulação com 21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW foi avaliada em microscópio confocal, que possui uma regulagem mais fina dos parâmetros utilizados, mas também não foi verificada penetração (**Figura 23H**) Portanto, conclui-se que as formulações contendo diferentes tipos de quitosana não atingiram o objetivo de promover a penetração do siRNA-FAM padrão utilizado.

O grau de desacetilação e o peso molecular influenciam o grau de interação entre o siRNA a quitosana e, em nanopartículas, as quitosanas de alto peso molecular tendem a complexar com siRNA mais prontamente do que as de baixo peso molecular (RUDZINSKI; AMINABHAVI, 2010; KIANG et al., 2004). Com o peso molecular constante, quanto menor o grau de desacetilação, menor a interação com o ácido nucleico e maior quantidade de quitosana é necessária para haver complexação (KIANG et al., 2004). Entretanto, um elevado grau de desacetilação e/ou alto peso molecular podem promover grande interação com siRNA e retardar a liberação do mesmo (RUDZINSKI; AMINABHAVI, 2010; KIANG et al., 2004; MAO et al., 2010), portanto o ideal é a utilização de materiais combinando características favoráveis, como baixo peso molecular e elevado grau de desacetilação ou com maior peso molecular e menor grau de desacetilação. Neste estudo foi utilizada uma quitosana com baixo peso molecular e elevado grau de desacetilação e outra com peso molecular médio e grau de desacetilação baixo.



**Figura 23** – Penetração de siRNA-FAM em córnea bovina após 6 h da aplicação tópica. Legenda: (A) tampão HEPES; (B) 20 % poloxamer + 1 % quitosana LMW; (C) solução aquosa de siRNA-FAM; (D) 20 % poloxamer + 1 % quitosana LMW contendo siRNA-FAN; (E) tampão HEPES; (F) 21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW; (G) solução aquosa de siRNA-FAM; (H) 21 % poloxamer + 1 % quitosana MMW contendo siRNA-FAN; (1) Epitélio; (2) Estroma; (3) Endotélio; (4) Formulação complexada com siRNA.

Apesar da utilização de amostras de quitosana que possuíam características desejáveis, o sistema de liberação na forma de gel pode não ter favorecido a compactação do gene, consequente dificultado penetração do siRNA. Portanto, os sistemas de liberação desenvolvidos, contendo quitosanas com diferentes características, pode não ter favorecido a liberação *in vitro* pelo fato de o siRNA ser

complexado de forma irreversível à formulação desenvolvida e/ou devido ao tipo de sistema de liberação não favorecer a penetração do ácido nucleico. A complexação do sistema é importante para proteção e vetorização do siRNA, entretanto, ela deve ser feita de forma reversível para garantir a liberação do mesmo dentro da célula (ROSSI, 2005).

## 5.4. Obtenção e caracterização do sistema líquido cristalino funcionalizado com ácido hialurônico

#### 5.4.1 Análise por microscopia de luz polarizada

A microscopia ótica polarizada é utilizada para observar os padrões das texturas de um material líquido cristalino e, em alguns casos, a ordem particular das mesofases pode ser identificada. Materiais anisotrópicos possuem propriedades óticas que mudam dependendo da orientação da luz incidente com o eixo cristalográfico. A propagação da direção da luz através de uma substância anisotrópica determina o grau do índice de refração. A diferenciação de fases é observada pelas diferentes velocidades que a luz propaga pelo material (SHANKS; STASZCZYK, 2012).

A análise por microscopia de luz polarizada é comumente realizada para observar a presença de birrefringência em cristais líquidos que apresentam anisotropia (HELLEDI; SCHUBERT, 2001; BORNÈ et al., 2001; SHANKS; STASZCZYK, 2012; AEINLENG et al., 2012). Por ser uma técnica simples, rápida e pouco dispendiosa, seu uso permite caracterizar e fazer a triagem de formulações (BORNÈ et al., 2001).

Primeiramente, os sistemas de liberação compostos por cristais líquidos foram avaliados utilizando diferentes concentrações de MO, concentração fixa de 0,4 % de PEI e fase aquosa sem NaCl. As formulações com 10, 15, 20 e 25 % de MO apresentaram birrefringência (**Figura 24**), aparentemente característica da mesofase hexagonal, com estabilidade variável durante doze dias de observação. A estabilidade foi menor para o produto contendo 25 % de MO e, devido a menor concentração de MO empregada e a maior estabilidade e reprodutibilidade entre as

avaliações realizadas em triplicata, o sistema contendo 10 % de MO foi utilizado para maiores investigações.



**Figura 24** – Fotomicrografias obtidas utilizando microscopia de luz polarizada após 12 dias de manipulação (x10). (A) 10 % MO/PEI; (B) 15 % MO/PEI; (C) 20% MO/PEI; (D) 25 % MO/PEI.

A interferência na formação de fases cristalinas pela adição de NaCI foi avaliada no sistema contendo 10 % de MO. Os cristais líquidos compostos por MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) foram preparados utilizando ou não 12 mg NaCI na fase aquosa e foram deixados em repouso para estabilização da fase cristalina, que foi observada durante quinze dias utilizando microscopia de luz polarizada (**Figura 25**).

A presença de NaCI na fase aquosa não prejudicou a formação de fases cristalinas e, nas amostras avaliadas, aparentemente contribuiu para maior estabilidade e formação de mesofases birrefringentes. Este fato foi observado em estudo de difração de raios X que demonstrou que, quando a MO está completamente hidratada, a presença de NaCI favorece a formação de fase hexagonal ao invés da fase cúbica (CAFFREY, 1987). Também foi possível observar que em ambas as formulações a intensidade de formação de fases cristalinas foi aumentando com o passar do tempo. A amostra observada um dia após a manipulação apresentou pouca birrefringência, já as amostras analisadas quinze dias após a manipulação demonstraram maior birrefringência (**Figura 25**). Este

efeito foi mais evidente no sistema contendo NaCI e pode-se dizer que a formulação tendeu a estabelecer e estabilizar a formação da fase cristalina birrefringente de acordo com o tempo. A **Figura 25 C1 e C15** ilustra que a MO sem estar associada ao PEI não apresentou birrefringência.



**Figura 25** – Fotomicrografias obtidas a partir de amostras analisadas durante 15 dias, utilizando microscopia de luz polarizada (x10). Legenda: (A) 10% MO/PEI + tampão contendo 12 mg de NaCl; (B) 10% MO/PEI + tampão sem NaCl; (C) 10% MO + tampão contendo NaCl; (1; 2; 5; 7 ou 15) indica o número de dias que a amostra foi analisada após a manipulação.

Nos sistemas de liberação desenvolvidos, observou-se pouca birrefringência no primeiro dia de estabilização da formulação. A partir do segundo dia houve maior evidência da estabilização do sistema cristalino. Como seria inviável esperar a completa estabilização da fase observada por muitos dias, optou-se por deixar o sistema em repouso por dois dias. Após esse período, as formulações foram dispersas em um sistema coloidal utilizado nas demais caracterizações realizadas nesse estudo. A **Figura 26** demonstra o aspecto do sistema de liberação desenvolvido antes e após a dispersão. Nos sistemas não dispersos foi realizada triagem com base na observação da formação de fases cristalinas, que levou a escolha da formulação que foi dispersa e complexada com siRNA e/ou HA.



**Figura 26** – Ilustração do sistema líquido cristalino composto de MO e PEI antes da dispersão (A), quando é feita a observação de birrefringência das fases cristalinas em microscópio de luz polarizada e após a dispersão (B), o sistema nanométrico é complexado ao siRNA e/ou HA para caracterização da formulação.

#### 5.4.2. Avaliação da osmolalidade das dispersões de cristais líquidos

No desenvolvimento do sistema de liberação líquido cristalino a osmolalidade das formulações foi avaliada, com o intuito de obter sistemas isotônicos. As amostras foram mensuradas em osmômetro em sua fórmula original e também diluídas com água mimetizando a incorporação da solução de siRNA.

É possível observar na **Tabela 5** que o tampão foi quem mais contribui para a osmolalidade do produto, visto que, mesmo utilizando o dobro da quantidade de MO (20 % de MO) não foi observado aumento expressivo na osmolalidade. Somente a
formulação contendo 20 % de MO foi isotônica, entretanto após a diluição na mesma proporção da incorporação de siRNA, todos os sistemas se tornam hipotônicos. Portanto, 12 mg de NaCl foi adicionado à fase aquosa do sistema contendo 10 % de MO, pois após a diluição obteve-se um valor desejado de osmolalidade.

**Tabela 5** – Osmolalidade da dispersão de cristais líquidos de MO/PEI/fase aquosa (0,6:0,012:2,4 p/p/p e 0,3:0,012:2,7 p/p/p) em associação ou não com HA; antes e após a diluição com água, mimetizando a incorporação da solução de siRNA.

Osmolalidade mensurada antes da diluição	(mOsm/Kg)		
Tampão TRIS com 1,5% poloxamer	200,30 (±1,2)		
20 %MO/PEI	284,00 (±1,0)		
10 %MO/PEI	241,00 (±0,0)		
10 %MO/PEI + 12 mg NaCl	370,00 (±6,2)		
10 %MO/PEI + 12 mg NaCl + HA 0,02 %	381,67 (±3,1)		
10 %MO/PEI + 12 mg NaCI + HA 0,06 %	367,33 (±2,1)		
Osmolalidade mensurada após a diluição	(mOsm/Kg)		
20 %MO/PEI	238,00 (±2,7)		
10 %MO/PEI	187,00 (±3,0)		
10 %MO/PEI + 12 mg NaCl	288,00 (±2,8)		
10 %MO/PEI + 12 mg NaCl + HA 0,02 %	291,00 (±1,0)		
10 %MO/PEI + 12 mg NaCI + HA 0,06 %	280,67 (±2,1)		

Os sistemas de liberação foram complexados com HA em diferentes concentrações, utilizando uma solução de HA a 0,5 % preparada com o mesmo tampão utilizado na fase aquosa da formulação (sem adição de NaCl). A incorporação do HA não teve grande influência na osmolalidade do produto. Quando a solução de HA foi acrescentada houve pequena variação na osmolalidade, provavelmente devido ao erro presente na aferição do volume adicionado da solução de HA. Como a maior variação foi observada quando a maior concentração de HA foi utilizada, o uso do tampão contendo NaCl na solução de HA poderia evitar a variação observada.

Como a adição de 12 mg de NaCl ao sistema de liberação líquido cristalino não influenciou a formação de fases cristalinas (**item 5.4.1**) e a sua incorporação permitiu a obtenção de formulações isotônicas, o NaCl foi adicionado à fase aquosa para as demais caracterizações realizadas neste estudo.

#### 5.4.3. Análise da carga superficial das dispersões de cristais líquidos

Após a dispersão em ultrassom, a formulação contendo 10 % de MO e 0,4 % de PEI foi complexada com o siRNA e/ou com ácido hialurônico a 0,02 e 0,06 %. Como o HA é um polieletrólito aniônico foi necessário avaliar a influência da sua adição na formulação, então a incorporação desses compostos em diferentes ordens foi avaliada.

O potencial zeta encontrado foi pouco positivo para todos os sistemas avaliados. A associação com siRNA e 0,02 % de HA provocou uma pequena diminuição dos valores de carga superficial. Quando 0,06 % de HA foi incorporado a diminuição do potencial zeta foi mais evidente e a ordem de adição do siRNA e HA não influenciou a carga residual do sistema (**Tabela 6**).

A avaliação da carga residual do sistema de liberação é importante para caracterizar um sistema de liberação de genes. Apesar de se esperar que um residual positivo seja necessário para uma liberação efetiva, outros sistemas de liberação que utilizam o HA resultaram em valores bastante negativos de potencial zeta e, mesmo assim, a formulação foi efetiva para complexar o siRNA e atingir os objetivos do estudo (JIANG et al., 2008; FUENTE et al., 2008a). Portanto, os resultados obtidos de carga residual foram satisfatórios, ponderando-se que o sistema de liberação teria capacidade de complexar o siRNA e HA adicionados.

Potencial Zeta (mv)					
10 % MO/PEI	+ 6,71 (±0,35)				
10 % MO/PEI + siRNA	+ 5,99 (±0,17)				
10 % MO/PEI + HA 0,02 %	+ 6,67 (±0,04)				
10 % MO/PEI + HA 0,06 %	+ 4,76 (±0,15)				
10 % MO/PEI + siRNA + HA 0,02 %	+ 6,46 (±0,44)				
10 % MO/PEI + siRNA + HA 0,06 %	+ 4,33 (±0,45)				
10 % MO/PEI + HA 0,02 % + siRNA	+ 6,89 (±0,27)				
10 % MO/PEI + HA 0,06 % + siRNA	+ 4,01 (±0,28)				

**Tabela 6** – Análise de potencial zeta da formulação composta de cristais líquidos de MO/PEI/fase aguosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) em associação com siRNA e HA.

#### 5.4.4. Análise do tamanho de partícula das dispersões de cristais líquidos

O tamanho ideal de nanopartículas para aplicação oftálmica é de 100 a 500 nm (NAGARWAL et al., 2009) e este diâmetro médio de partícula também é desejado no desenvolvimento dos sistemas de liberação para veiculação de siRNA (REISCHL; ZIMMER, 2009). Portanto, o tamanho de partícula obtido no sistema líquido cristalino funcionalizado com ácido hialurônico em associação com siRNA, está dentro dos parâmetros desejados (**Tabela 7**). Foi possível observar um pequeno aumento do tamanho de partícula quando o siRNA e HA foram incorporados à dispersão de cristais líquidos. A ordem de incorporação do siRNA e HA teve pouco influência no tamanho médio das partícula obtidas.

A polidispersividade é a medida da homogeneidade das partículas que varia de 0 a 1 e quanto mais próximo de zero mais homogêneo é o tamanho das partículas. Os valores de polidispersividade encontrados para todos os sistemas avaliados foram próximos de 0,2 e valores similares foram obtidos para nanopartículas carreadoras de siRNA (TAETZ et al., 2009). Portanto, a variação da homogeneidade das partículas obtidas nos sistemas desenvolvidos foi considerada aceitável.

Eormulaçãos	Tamanho de	Polidispersividade	
Formulações	Partícula (nm)		
10 % MO/PEI	158,83 (±0,85)	0,19 (±0,01)	
10 % MO/PEI + siRNA	161,00 (±6,01)	0,18 (±0,04)	
10 % MO/PEI + HA 0,02 %	166,37 (±0,57)	0,21 (±0,02)	
10 % MO/PEI + HA 0,06 %	]71,70 (± 1,84)	0,19 (± 9,04) =	
10 % MO/PEI + siRNA + HA 0,02 %	160,40 (±0,10)	0,18 (±0,01)	
10 % MO/PEI + siRNA + HA 0,06 %	175,83 (±2,72)	0,22 (±0,01)	
10 %MO/PEI + HA 0,02 % + siRNA	166,50 (±1,65)	0,19 (±0,01)	
10 %MO/PEI + HA 0,06 % + siRNA	168,37 (±1,06)	0,19 (±0,01)	

**Tabela 7** – Análise do tamanho de partícula e polidispersividade da formulação composta de cristais líquidos de MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) em associação com siRNA e HA.

# 5.4.5. Avaliação da complexação do siRNA às nanodispersões de cristal líquido funcionalizado com ácido hialurônico

Os sistemas de liberação devem ser capazes de interagir com o siRNA. As moléculas catiônicas são utilizadas como vetores para que a interação eletrostática com o siRNA aniônico favoreça a liberação da molécula de forma ativa no citoplasma das células. Portanto, a complexação do siRNA viabiliza a sua aplicação por protegê-lo frente a degradação enzimática e também por promover a absorção celular e a liberação no citoplasma das células (SHEN et al., 2011). No sistema de liberação desenvolvido foi importante avaliar se a presença do polímero aniônico HA não iria concorrer com o siRNA para formar o complexo com a formulação contendo o vetor catiônico PEI, desta forma a incorporação desses compostos em diferentes ordens foi avaliada.

A Figura 27 ilustra que somente a banda do siRNA livre foi visível, portanto quando o siRNA foi adicionado às formulações, todas foram capazes de complexálo, independentemente da presença e concentração de HA utilizada. A ordem de adição do siRNA e HA também não influenciou a interação do ácido nucleico com a formulação. Como a ordem de adição não influenciou a carga residual e o tamanho de partícula, o HA foi adicionado antes do siRNA nos demais experimentos por ser mais a forma mais prática.

Além da habilidade de complexação, a estabilidade do siRNA presente nos sistemas de liberação desenvolvidos foi igualmente avaliada. A heparina é um eletrólito com carga residual negativa, que compete com o siRNA pela interação com o sistema de liberação positivo, então ela foi utilizada em uma concentração que promoveu o deslocamento do siRNA da formulação (XIONG; ULUDAG; LAVASANIFAR, 2009; SHEN et a., 2011). Após a descomplexação do siRNA, utilizando heparina, foi possível observar a presença das bandas do siRNA, indicando que a formulação não degradou o siRNA. Os polímeros aniônicos avaliados - heparina e HA - não apresentaram banda no gel e também não degradaram o siRNA. A única alteração evidenciada foi que a banda da associação da heparina e o siRNA apresentou-se um pouco menos intensa do que a do siRNA sozinho.



**Figura 27** – Eletroforese da dispersão de cristal líquido associada ao ácido hialurônico. A dispersão de cristais líquidos de MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) foi adicionada de siRNA e hialuronato de sódio (HA) a 0,02 % e 0,06 % em diferentes ordens de adição. A heparina foi utilizada para descomplexar o siRNA dos sistemas de liberação.

#### 5.4.6. Análise de difração de raios X a baixo ângulo

O método mais comum e informativo para investigar a estrutura espacial da matéria é baseado no fenômeno de difração de onda. A análise de difração de raios X a baixo ângulo é uma técnica amplamente utilizada para estudar estruturas. Nos experimentos de difração, um feixe de radiação atinge o objeto em estudo e o padrão do espalhamento é observado. Esta análise permite obter informações sobre a estrutura com resolução espacial, determinada pelo comprimento de onda irradiado (FEIGIN; SVERGUN; 1987).

A análise de difração de raios X a baixo ângulo é uma técnica que estuda características estruturais em tamanho coloidal. Qualquer processo de difração é caracterizado pela lei da reciprocidade, que dá uma relação inversa entre o tamanho de partícula e o grau de difração. As dimensões coloidais são muito maiores,

comparadas ao comprimento de onda dos raios X, o que proporciona uma variação angular baixa da difração observada (GLATTER; KRATKY, 1982).

Os cristais líquidos possuem características de ordem, presentes nos sólidos cristalinos e evidenciadas pela difração de raios X, assim como características de desordem, evidenciadas pela fluidez típica dos líquidos (SINGH, 2000). Uma propriedade característica de todas as estruturas cristalinas é a presença de uma organização orientacional. Nos cristais a localização relativa de todos os átomos é fixa, definindo a estrutura cristalina do material, que pode adotar diferentes simetrias tridimensionais (HIDE, 2001). A difração de raios X a baixo ângulo permite a caracterização de fases líquido cristalinas e tem sido utilizada em estudos de sistemas de liberação contendo MO (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001; YANG; ARMITAGE; MARDER, 2004).

Isto é possível, porque os diferentes tipos de fases cristalinas proporcionam diferentes padrões de difração de raios X. A fase hexagonal possui um padrão de difração que tem a proporção de 1;  $1/\sqrt{2}$ ;  $1/\sqrt{3}$ ;  $1/\sqrt{7}$  entre as distâncias interplanares. Já para a fase cúbica a razão entre as distâncias interplanares é de 1;  $1/\sqrt{2}$ ;  $1/\sqrt{3}$ ;  $1/\sqrt{4}$ ;  $1/\sqrt{5}$ ;  $1/\sqrt{6}$ ;  $1/\sqrt{8}$  (HELLEDI; SCHUBERT, 2001).

Diferentes formulações compostas por MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) foram preparadas e deixadas em repouso para estabilização da fase cristalina durante um, dois, sete e quinze dias, respectivamente. Após esse período, as amostras foram dispersas em sonicador e a formulação estabilizada por dois dias foi complexada ou não com siRNA e/ou HA para então realizar as análises de difração de raios X. Através da análise dos picos de reflexão presente nos difratogramas (**Figura 28**), as razões entre as distâncias interplanares foram obtidas e o parâmetro de rede (a) foi determinado. De acordo com as diferentes proporções dos padrões de difração obtidos, o tipo de fase líquido-cristalina de cada amostra foi determinado, conforme apresentado na **Tabela 8**.

Foi possível observar que a amostra deixada em repouso por um dia apresentou uma mistura de fase cúbica e hexagonal. O mesmo padrão foi evidenciado para as amostras dispersadas dois e sete dias após a manipulação, entretanto conforme a formulação foi deixada em repouso por mais dias, ocorreu uma estabilização para a formação da fase hexagonal. Isso é evidenciado pela análise da amostra dispersada quinze dias após a manipulação, em que somente a fase hexagonal foi observada. Esses resultados estão em conformidade com as observações feitas durante a análise por microscopia de luz polarizada, em que a presença de maior birrefringência foi observada com o maior tempo de repouso das amostras. Como a fase cúbica é isotrópica, a anisotropia observada foi atribuída à fase hexagonal. Assim, pode-se constatar que o sistema de liberação desenvolvido apresentou clara transformação da fase cúbica para a fase hexagonal com o tempo.

É importante ressaltar que a formulação deixada em repouso por dois dias foi utilizada para associação com HA e siRNA e, nesse período, o sistema de liberação avaliado foi composto por uma mistura de fase cúbica e hexagonal. A associação da dispersão com siRNA e HA não proporcionou alteração da estrutura cristalina da dispersão (**Figura 28B** e **Tabela 8**), mas pode-se sugerir que, devido às diferenças entre a organização das estruturas cristalinas, a cinética de liberação da fase hexagonal e cúbica seriam distintas (FARKAS et al., 2000) e poderiam promover diferentes padrões de liberação do siRNA.

Outra comparação importante entre as diferentes amostras foi a avaliação dos valores de parâmetro de rede. O parâmetro de rede representa a distância entre os centros das micelas ordenadas da fase líquido cristalina, desta forma, obtêm-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 (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 anfifílicas particionadas 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. Por outro lado, 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).

A incorporação de aditivos aos sistemas líquido cristalinos pode alterar a auto-organização dos lipídeos e, consequentemente, controlar a estrutura da fase formada (ROSSETTI et al., 2011). Essas alterações podem se manifestar em completa mudança de fase ou apenas em variações no parâmetro de rede da

estrutura (PHAN et al., 2011). A análise por SAXS das dispersões líquido cristalinas demonstrou que a adição de componentes (HA ou siRNA) não provocou alteração da estrutura cristalina. Entretanto, o parâmetro de rede da fase hexagonal teve pequena diminuição com a introdução do HA e do siRNA, correspondendo a aproximadamente 6.10 nm para a formulação sem os aditivos e a 6.06 nm guando o HA foi incorporado, sendo que este valor foi mantido quando o siRNA foi incorporado. A diminuição do valor de parâmetro de rede pode ser explicada pelo fato do HA ser um polímero hidrossolúvel que, para ser solvatado pelas moléculas de água, pode ter provocado à perda de água dos canais da rede cristalina, aproximando as cadeias lipídicas. Já o parâmetro de rede da fase cúbica de aproximadamente 8,40 nm apresentou uma tendência de diminuir com a introdução do HA com valor próximo a 8.34 nm. provavelmente devido ao mesmo motivo descrito anteriormente. Entretanto, guando o siRNA foi adicionado à associação do cristal líquido com HA o parâmetro de rede apresentou um pequeno aumento de aproximadamente 8,42 nm, sugerindo uma possível distribuição do siRNA no interior da estrutura cristalina cúbica.

O parâmetro de rede da estrutura cristalina sofreu algumas alterações conforme as mesofases foram se estabilizando com o tempo. O parâmetro de rede da fase hexagonal diminuiu continuamente conforme a estrutura cristalina se estabilizava, até a completa formação da fase hexagonal durante quinze dias. Os valores de parâmetro de rede encontrados foram de aproximadamente 6,12 nm com um dia e de 5,75 nm com quinze dias, quando somente a fase hexagonal foi observada. Essa alteração pode ser atribuída à própria reorganização da estrutura cristalina conforme ela foi se estabilizando para a formação da fase hexagonal. Já o parâmetro de rede da fase cúbica aumentou com o tempo e não foi observada com quinze dias. Na amostra avaliada com um dia, o valor de parâmetro de rede foi de aproximadamente 8,22 nm e com sete dias foi de 8,46 nm. Esse aumento também pode ter ocorrido pela reorganização da estrutura cristalina com o tempo. No sistema de liberação avaliado, quanto maior o tempo de repouso, maior a formação da fase hexagonal com menores distâncias entre as micelas ordenadas da fase cristalina.



**Figura 28** - Difratogramas de raios X das nanodispersões de MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) dispersas após 1, 2, 7 e 15 dias após a manipulação. Compilação dos difratogramas obtidos com as amostras estabilizadas durante diferentes períodos (A); Compilação dos difratogramas da associação de siRNA e HA à formulação deixada em repouso por 2 dias (B).

**Tabela 8:** Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões dos sistemas compostos de MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) associados com 0,02% de HA e/ou com siRNA.

Amostra	q (nm <sup>-1</sup> )	d (nm)	Razão	Parâmetro de rede (nm)	Estrutura
	0,77 1,08 1,32	8,19 5,81 4,77	1:1 1:√2 1:√3	a <sub>c</sub> = 8,22 ±0,04	Cúbica
MO/PEI 1 dia	1,19 2,05 2,37	5,29 3,06 2,65	1:1 1:√3 1:√4	a <sub>h</sub> = 6,12 <u>+</u> 0,01	Hexagonal
	0,75	8,40	1:1	a <sub>c</sub> = 8,40	Cúbica
MO/PEI 2 dias	1,19 2,06 2,38	5,28 3,05 2,64	1:1 1:√3 1:√4	a <sub>h</sub> = 6,10 <u>+</u> 0,00	Hexagonal
MO/PEL2 dias	0,75	8,34	1:1	a <sub>c</sub> = 8,34	Cúbica
+ HA	1,20 2,07 2,39	5,24 3,02 2,62	1:1 1:√3 1:√4	a <sub>h</sub> = 6,06 ±0,01	Hexagonal
MO/PEL2 dias	0,75	8,42	1:1	a <sub>c</sub> = 8,42	Cúbica
+ HA + siRNA	1,20 2,07 2,39	5,25 3,03 2,62	1:1 1:√3 1:√4	a <sub>h</sub> = 6,06 ±0,01	Hexagonal
	0,74	8,46	1:1	a <sub>c</sub> = 8,46	Cúbica
MO/PEI 7 dias	1,22 2,12 2,43	5,16 2,98 2,58	1:1 1:√3 1:√4	a <sub>h</sub> = 5,96 <u>+</u> 0,00	Hexagonal
MO/PEI 15 dias	1,26 2,19 2,53	4,98 <b>2,88</b> 2,49	1:1 1:√3 1:√4	a <sub>h</sub> = 5,75 <u>+</u> 0,00	Hexagonal

a<sub>h</sub>: média do parâmetro de rede da estrutura hexagonal

ac: média do parâmetro de rede da estrutura cúbica

q: vetor de espalhamento

d: distâncias interplanares

Resultados representados como média + E.P.M.

#### 5.5. Estudos in vitro em fibroblastos L929

As células L929 são utilizadas como modelo padrão de expressão do receptor CD44, um receptor presente na superfície celular que se liga ao HA (CROCE et al., 2003: WIRANOWSKA et al., 2010). O HA tem sido estudado como molécula alvo para interação com receptor celular CD44 presente em fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e cancerosas (ISACKE; YARWOOD, 2002; AFIFY et al., 2005; SUZUKI et al., 2002; SHEN et al., 2011). O receptor CD44 foi descrito para as células epiteliais e conjuntivais da córnea humana e uso do HA para direcionar e aumentar a absorção em tecidos específicos tem sido uma proposta efetiva para administração de genes (FUENTE et al., 2008a; FUENTE et al., 2008b; SHEN et al., 2011). O estudo de penetração in vitro em córnea bovina não foi realizado para o sistema de liberação líquido cristalino, pois era necessário avaliar a endocitose via um receptor da membrana celular, portanto seria necessário que as células da córnea mantivessem atividade metabólica constante, que poderia estar comprometida no tecido dissecado mantido sob as condições do experimento de penetração in vitro.

# 5.5.1. Estudo de viabilidade celular das nanodispersões de cristal líquido funcionalizado com ácido hialurônico

Um aspecto importante no desenvolvimento de um sistema de liberação é avaliar a toxicidade do mesmo frente às células alvo utilizadas em um estudo (FUENTE et al., 2008a). A cultura de células pode ser utilizada como um modelo *in vitro* de toxicidade para triagem de um sistema em um organismo vivo. As células são utilizadas devido à facilidade de cultivo, rápido crescimento, sensibilidade a efeitos tóxicos e resposta imediata (SCHERLIESS, 2011).

A fim de verificar os possíveis efeitos citotóxicos sobre as células L929, as formulações foram avaliadas através do ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT. Este ensaio detecta somente as células vivas e é utilizado para avaliar a citotoxicidade, proliferação e ativação de células. O MTT detecta a sobrevivência e proliferação celular através da capacidade da célula em transformar o sal tetrazólico, que apresenta coloração amarelada, em cristais formazan de coloração azul escuro.

A metabolização do sal ocorre somente em células viáveis pela enzima succinildesidrogenase mitocondrial. As principais vantagens desse ensaio colorimétrico são sua rapidez, precisão e ausência do uso de radioisótopos (MOSMANN, 1983).

Nesse ensaio foi possível notar redução da viabilidade celular quando as soluções de PEI em associação ou não ao HA foram utilizadas. A viabilidade celular da solução de PEI foi a mais tóxica para as células, apresentando valor de 42,26 % (± 3,58). Quando HA foi associado à solução, apesar de ainda reduzir significantemente a viabilidade celular, demonstrou ser menos tóxico do que o PEI sozinho de forma significativa (p<0,001). O acréscimo de 0,06 % e 0,02 % de HA proporcionou porcentagens de viabilidade celular de 65,88 % (± 5,60) e 73,35 % (± 6,67), respectivamente (**Figura 29**).

A dispersão de cristais líquidos, associada ou não a diferentes concentrações de HA, não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle (**Figura 29**). Os valores encontrados para a dispersão de MO/PEI foi de 111,41 % ( $\pm$  12,44) e quando 0,06 % e 0,02 % de HA foi associado, os valores encontrados foram de 110,91 % ( $\pm$  12,56) e 88,36 % ( $\pm$  14,10), respectivamente. Portanto, a dispersão de cristais líquidos funcionalizada ou não com HA demonstrou não ser tóxica para as células utilizadas no estudo.



**Figura 29** - Efeito do sistema MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p) associado ou não com 0,02 % e 0,06 % de HA na viabilidade celular de fibroblastos da linhagem L929. Soluções de PEI associadas ou não às diferentes concentrações de HA também foram avaliadas. Os resultados representam a média de seis determinações <u>+</u> EPM e as diferenças estatísticas foram detectadas pelo teste *posthoc* de Newman-Keuls, \*\*\*p<0,001 em relação ao controle (células sem tratamento).

O fato de os sistemas de liberação desenvolvidos não terem sido tóxicos para a linhagem L929 foi um aspecto importante avaliado, pois uma formulação muito tóxica poderia inviabilizar o estudo de transfecção celular. Além disso, os resultados obtidos permitiram inferir que o uso das formulações estabelecidas não causaria efeitos tóxicos. Entretendo, para uso oftálmico, um estudo de viabilidade celular em linhagem específica de células epiteliais da córnea se faz necessário para qualquer afirmação conclusiva quanto ao efeito tóxico do produto para essas células.

## 5.5.2. Estudo de transfecção celular das nanodispersões de cristal líquido funcionalizado com ácido hialurônico

O mecanismo de transfecção de um sistema de liberação consiste de uma sequência de diferentes mecanismos de transporte e desarranjo do complexo administrado. O primeiro passo é a interação do complexo com a superfície celular, seguida da sua internalização. Com este propósito, moléculas ligantes a receptores específicos podem ser adicionadas ao sistema de liberação, visando o direcionamento a células específicas e a absorção mediada via receptor celular. Em seguida, o complexo deve ser capaz de escapar do endossoma para finalmente atingir o citoplasma da célula (CARTIER; RESZKA, 2002).

A capacidade do sistema de liberação penetrar a linhagem L929 foi observada mediante a utilização do siRNA marcado com sonda fluorescente (siRNA-FAM). A dispersão de cristais líquidos em associação com o HA promoveu menor transfecção celular do que a dispersão de cristais líquidos contendo somente MO/PEI (**Figura 30**), de forma que a absorção celular diminuiu proporcionalmente à concentração de HA empregada. A solução de PEI também promoveu maior transfecção celular do que quando foi associada ao HA.



Formulações em associação com siRNA-FAM



Soluções em associação com siRNA-FAM



Formulações sem siRNA-FAM

**Figura 30** – Transfecção celular em fibroblasto L929 dos sistemas compostos por MO/PEI/fase aquosa (0,3:0,012:2,7 p/p/p). (A) MO/PEI + siRNA-FAM; (B) MO/PEI + HA 0,02 % + siRNA-FAM; (C) MO/PEI + HA 0,06 % + siRNA-FAM; (D) solução PEI 0,4 % + siRNA-FAM; (E) solução PEI 0,4 % + HA 0,06 % + siRNA-FAM; (F) tampão TRIS; (G) MO/PEI; (H) MO/PEI + HA 0,02 %; (I) MO/PEI + HA 0,06 %.

Em uma avaliação do efeito da absorção celular de HA, os efeitos observados foram independentes do peso molecular e uma molécula de elevado peso molecular (1.600 kDa) foi testada (CROCE et al., 2003). Este estudo mostra que existe absorção celular de HA, mesmo com elevado peso molecular, entretanto como o

efeito foi o resultado observado e não a quantidade de HA absorvida, talvez uma pequena dose absorvida foi suficiente para promover efeito. No presente estudo o HA foi utilizado para promover maior transfecção, entretanto, possivelmente o tamanho da molécula do HA empregada (1070 kDa) pode ter sido responsável por comprometer a absorção celular. Os trabalhos que apresentaram resultados satisfatórios de transfecção celular (JIANG et al., 2008; FUENTE et al., 2008a) utilizaram o HA com peso molecular de 130-170 kDa, portanto, uma molécula com menor peso molecular poderia aumentar a eficiência de absorção do sistema de liberação desenvolvido.

Apesar da solução do PEI ter promovido absorção celular, o estudo de viabilidade celular com a linhagem L929 demonstrou que ela é mais tóxica para as células do que a dispersão de cristais líquidos em que este componente catiônico está associado ao sistema. Portanto, o sistema de liberação proposto torna-se mais vantajoso por apresentar menor toxicidade e também promover a absorção celular. Entretanto, sistemas funcionalizados com o HA utilizado (1070 kDa) não demonstraram maior capacidade de promover a absorção celular do siRNA, sugerindo que HA com menor massa molecular deve ser estudado com este propósito.

Finalmente, considerando os dois sistemas estudados, as nanodispersões apresentaram maior potencial de aplicação como sistema de liberação de siRNA para via ocular, uma vez que comparado com os géis, os sistemas nanoparticulados possuem a propriedade de compactar o siRNA de alto peso molecular, facilitando a captação celular. Talvez, no gel termorreversível, o tipo de interação entre a quitosana e o siRNA, que permitiu a complexação do mesmo, não foi favorável para promover a penetração *in vitro* nas condições experimentais avaliadas. Além disso, utilizar um produto viscoso que forma gel inviabiliza alguns estudos, como o estudo em cultura de células, pois o produto forma gel na temperatura de incubação das células. Outra desvantagem na utilização da quitosana num sistema de liberação é a dificuldade de obtenção de diferentes lotes do material com o mesmo peso molecular e grau de desacetilação, o que dificulta a padronização da formulação.

### 6. CONCLUSÕES

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

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

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

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

## 7. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CASTANOTTO, D.; ROSSI, J. J. The promises and pitfalls of RNA-interferencebased therapeutics. **Nature**, v. 457, p. 426-433, 2009. CECH, T. R.; BASS, B. L. Biological Catalysis by RNA. Annual Review of Biochemistry, v. 55, p. 599-629, 1986.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

IZANT, G. J.; WEINTRAUB, H. Inhibition of Thymidine Kinase Gene Expression by Anti-Sense RNA: A Molecular Approach to Genetic Analysis. **Cell**, v. 36, p. 1007-1015, 1964.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

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

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

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

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

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes In trans. **The Plant Cell**, v. 2, p. 279-289, 1990.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ROSSETTI, F. C. et al. Analysis of Liquid Crystalline Nanoparticles by Small Angle X-Ray Diffraction: Evaluation of Drug and Pharmaceutical Additives Influence on the Internal Structure. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TYLE, P. Liquid Crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: Polymer and aggregate systems.** New York: VCH Publishers, 1989. chapter 4, p. 125-162, 1989.

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

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

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

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

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

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

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

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

YAGHMUR, A.; GLATTER, O. Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. Advances in Colloid and Interface Science, v. 147-148, p. 333-342, 2009.

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

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

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

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

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

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

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