UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MARGARETE MORENO DE ARAÚJO

Nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para veiculação de siRNA na terapia antisense de doenças cutâneas

Ribeirão Preto

2017

MARGARETE MORENO DE ARAÚJO

Nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para veiculação de siRNA na terapia antisense de doenças cutâneas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Nanotecnologia Aplicada às Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Coorientadora: Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato

Ribeirão Preto

2017

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

Araújo, Margarete Moreno de
Nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para veiculação de siRNA na terapia antisense de doenças cutâneas. Ribeirão Preto, 2017.
139 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Nanotecnologia aplicada às Ciências Farmacêuticas.
Orientadora: Bentley, Maria Vitoria Lopes Badra.
Coorientadora: Marcato, Priscyla Daniely

1. siRNA. 2. Pele 3. Nanopartícula híbrida polimérico-lipídica. 4. Terapia gênica 5. Aplicação tópica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Margarete Moreno de Araújo

Nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para veiculação de siRNA na terapia antisense de doenças cutâneas.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Nanotecnologia Aplicada à Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

A minha saudosa mãezinha Maria de Lourdes, ao meu amado e querido pai Daniel e aos melhores presentes que meus pais me deram, minhas irmãs incríveis, maravilhosas e companheiras, Magnollya, Magda e Magally.

Agradecimentos

A Deus que é bom o tempo todo, amparou-me e deu-me forças para continuar apesar das dificuldades e por mais essa oportunidade.

Aos meus pais, Daniel e Lurdinha (*in memoriam*), que nunca mediram esforços em oferecer a mim e a minhas irmãs segurança, apoio, carinho e todo empenho em nos garantir a melhor educação. Mãe, a saudade é tamanha, mas o meu carinho e amor por você terá sempre a capacidade de alcançar as grandes conquistas, essa força e dedicação vem de você! Você foi mulher, mãe, guerreira e carregou no peito um coração onde cabe um mundo de lutas, de amor sem limites, de vitórias sem troféus. Não há como expressar toda minha felicidade e orgulho em dedicar este trabalho a você, como forma de agradecimento a todo o amor dado. Agradeço às minhas irmãs queridas, Magnollya, Magda e Magally, por sempre estarem comigo, apesar da distância, dando-me toda força e apoio que precisei. À minha família agradeço por toda confiança depositada. A vocês meu eterno agradecimento e amor.

Ao professor Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior, meu orientador no mestrado e professor Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa da UFRN que incentivaram minha vinda à Ribeirão Preto, vocês foram primordiais para que isso acontecesse.

A professora Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley que me acolheu e por toda dedicação e amor ao seu trabalho de orientadora, apoio, motivação, conhecimento compartilhado e confiança a mim depositada.

A minha coorientadora professora Dra. Priscyla Daniely Marcato, por me orientar sempre com dedicação, amor, paciência, incentivo, contribuição na ampliação dos meus conhecimentos, tanto no profissional, como no pessoal. Por valiosas lições que ultrapassaram as barreiras do laboratório e certamente me acompanharão para toda a vida.

Aos funcionários do laboratório de Tecnologia Farmacêutica José Orestes (pelas análises de DLS e NTA), Henrique Diniz (pelas análises de DSC) e Fabíola Garcia (pela imensa contribuição no estudo *in vivo*) obrigada pelo auxilio nas análises, atenção, seriedade com que desempenham seu trabalho e convivência amistosa.

À técnica Ivana Borin do departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras pelas análises de Microscopia de Força Atômica.

À professora Dra Kamilla Swiech Antonietto pela contribuição e disponibilização de equipamentos e materiais do Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares nos estudos com células.

Aos amigos da Pós-graduação, Livia Depieri, Livia Borghetti, Sônia Figueiredo, Hugo Favacho, Ivana Santos principalmente aos que convivi diariamente, Fernando Topan, Patricia Mazureki, Larissa Tofani, Marcelo Kravicz, Clemilton Cunha, Juliana Abriata, Marcela Luiz, Giovanni Raspantini, Robson Amaral, Isabella Suzuki. Cada item deste trabalho tem a contribuição e ajuda de cada um de vocês. Obrigada pelos momentos de alegria, e por tornarem o convívio na USP momentos de prazer e descontração.

À Amanda Godoi, Prycila Feitoza e Dayane Moraes sou imensamente grata pela amizade e apoio de vocês em tudo! Aprendo muito com vocês e sou muito feliz por tê-las em minha vida.

A Vinícius Scarpellini, gordo, pelo carinho, amor, força, incentivo, paciência e companheirismo.

Aos professores componentes da banca de qualificação Profa Dra Maria José Vieira Fonseca, Profa Dra Kamilla Swiech Antonietto, Prof Dr Armando da Silva Cunha Júnior; e aos professores componentes da banca de defesa da tese de doutorado, pelas contribuições dadas ao nosso trabalho.

À secretaria de Pós-graduação, aos funcionários, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de fazer parte de um centro de excelência e referência, e a CAPES pelo suporte financeiro.

Gratidão, respeito e homenagem a todos vocês que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

"Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho".

Thomas Jefferson

RESUMO

ARAÚJO, M. M. **Nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para veiculação de siRNA na terapia antisense de doenças cutâneas**. 2017. 139f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A terapia gênica por RNA de interferência (RNAi) trata-se de um processo de silenciamento pós-transcricional capaz de suprimir a expressão de um determinado gene. No entanto, para se tornar eficaz, a terapia gênica utilizando siRNA (*small interfering* RNA - siRNA) é dependente de uma eficiente liberação e expressão do acido nucléico nas células-alvo dentro dos tecidos ou órgãos. A literatura atual mostra algumas propostas de sistemas de liberação tópica de siRNA, entretanto, o uso de nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para complexação e liberação de siRNA na pele para o tratamento tópico de doenças cutâneas, ainda é pouco explorado, o que configura a inovação deste trabalho. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma nanopartícula hibrida lipídica associada a um polímero catiônico (NLS-PEI) como sistema de liberação tópica para siRNA, visando a terapia gênica como nova abordagem no tratamento de patologias cutâneas. Primeiramente a composição e o método de produção das NLS-PEI foram otimizados. Como polímero catiônico, utilizou-se a polietilenoimina (PEI). As NLS-PEIs otimizadas, compostas pelo lipídeo Compritol® 888 ATO (2,0%), Poloxamer 188 (1,5%) e PEI (0,15 e 0,25%), apresentaram-se esféricas com superfície lisa e um tamanho médio de 165 nm, potencial zeta médio de +20 mV, concentração de partículas de 10^{13}/mL e com alta estabilidade (90 dias a 4°C). Foi demonstrado, por DSC, que a PEI interage tanto com o tensoativo na superficie das nanoparticulas como também com o lipídeo. A avaliação de comportamento e ação *in vitro* das NLS-PEIs foi estudada em queratinócitos e fibroblastos, evidenciando que o tratamento não diminuiu a viabilidade celular e houve alta captação verificada por citometria de fluxo (acima de 80% de células transfectadas) e por microscopia confocal. No estudo *in vitro* de penetração das NLS-PEI complexado com siRNA-FAM em pele de orelha de porco, foi demonstrado a penetração cutânea aumentada de siRNA-FAM a partir das NLS-PEIs. Ensaio *in vivo* em modelo de inflamação cutânea aguda e crônica mostrou a eficácia das NLS-PEIs contendo siTNF-α, reduzindo a espessura da epiderme em comparação ao grupo controle, reduzindo o rubor, a descamação e os níveis da citocina pró-inflamatória TNF-α e seu RNAm correspondente. A NLS-PEI também promoveu a penetração cutânea das moléculas de siRNA nas camadas mais profunda da pele, *in vivo*. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que as formulações desenvolvidas são sistemas de liberação promissores para administração tópica de siRNA para o tratamento de patologias cutâneas na terapia gênica.

Palavras chave: siRNA, pele, nanopartículas hibridas lipídico-poliméricas, terapia gênica, aplicação tópica.

ABSTRACT

Araújo, M. M. **Hybrid Lipid-Polyethylenimine (PEI) nanocarriers for delivery topical siRNA for antisense therapy of skin diseases**. 2017. 139f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Small-interfering RNA (siRNA) has a high application potential for therapeutic silencing of pathologic or drug-resistance genes. Nonetheless, free siRNA molecules are known to have poor transfection efficiency and biological stability, so a carrier use is necessary. Lipid-polymeric nanocarriers are the new generation of nanoparticulate that have been used as siRNA carrier system and are attracting attention as novel colloidal drug carrier for topical use. In this context, the aim of this study was to develop of hybrid lipid-polyethylenimine nanocarriers (SLN-PEI) as topical delivery systems for siRNA. First, the SLN-PEI composition and production method were optimized. Polyethyleneimine (PEI) was used as cationic polymer. The optimized SLN-PEIs, composed of the lipid Compritol® 888 ATO (2.0%), Poloxamer 188 (1.5%) and PEI (0.15 and 0.25%), were spherical with a smooth surface and average size of 200 nm, mean zeta potential of +20 mV, mean number of particles per mL in the 10^{13} frame and remained stable for 90 days at 4 °C. It has been demonstrated by DSC that PEI interacts with both the surface surfactant of the nanoparticles and with the lipid. The evaluation SLN-PEI's behavior and *in vitro* action was studied in keratinocytes and fibroblasts, evidencing that the nanoparticles did not decrease cell viability and there was high cellular uptake evidenced by flow cytometry (above 80% of transfected cells) and by confocal microscopy. In the permeation *in vitro* study, it was demonstrated that SLN-PEI increased cutaneous penetration of siRNA-FAM. *In vivo* assay, in model of acute and chronic skin inflammation, demonstrated the efficacy of SLN-PEIs carrying siTNF-α, reducing epidermal thickness compared to control group, reducing redness, desquamation and levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and its corresponding mRNA. SLN-PEI also promoted penetration of the siRNA molecules in the deeper layers of the skin, *in vivo*. In view of the results obtained, we can conclude that the formulations developed are promising delivery systems for topical administration of siRNA for the treatment of cutaneous pathologies in gene therapy.

Keywords: siRNA, skin, hybrid lipid-polyethylenimine nanocarriers, gene therapy, topical application.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura esquemática da pele (Adaptado de Pasparakis, 2014). 2

Figura 2 - Estrutura esquemática das vias de penetração cutânea (Adaptado de Zakrewsky et al., 2015). 5

Figura 3 - Mecanismo de interferência por RNA (Adaptado de Ozcan et al., 2015). 8

Figura 4 - Estrutura da molécula do siRNA. 10

Figura 5 - Esquematização do escape endossomal: (A) endossomo, (B) escape endossomal por desestabilização da membrana do endossomo, (C) escape endossomal pelo “efeito esponja de prótons” (Adaptado de Wan et al., 2013).....13

Figura 6 - Estrutura química do PEI ramificado. 15

Figura 7 - Ilustração esquemática da estrutura e preparação dos principais tipos de NPLs. (A) matriz monolítica e (B) núcleo-casca (Adaptado de WU, 2016).....18

Figura 8 - Representação da divisão da pele do camundongo para estudo, sendo A usado para ELISA, B usado para PCR e C embebido em formol tamponado. 37

Figura 9 - Esquema terapêutico de indução da inflamação crônica por TPA e tratamento com as formulações. 38

Figura 10 - Fluxograma dos ensaios realizados neste trabalho. 43

Figura 11 - Diâmetro e índice de polidispersão (PdI) das dispersões de NLS-PEIs, onde (A) corresponde as nanodispersões preparadas no ultra-turrax. (B) corresponde às nanodispersões preparadas no ultrassom. (C) corresponde às nanodispersões preparadas no ultra-turrax. 48

Figura 12 - Distribuição de tamanho de partículas em 3D por análise de rastreamento de nanopartículas. (A) NLS-PEI 0% (B) NLS-PEI 0,15%, (C) NLS-PEI 0,25%. 50

Figura 13 - Morfologia 2D e 3D das NLS-PEI 0,15 (A) e 0,25 % (B) por Microscopia de Força Atômica. 52

Figura 14 - Termogramas da PEI, poloxamer 188 e Compritol® 888 ATO 888 ATO puros, misturas físicas (MFs) e NLS-PEI 0,0; 0,15 e 0,25%.....53

Figura 15 - Gráficos correspondentes ao diâmetro (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (C) das NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25% em função do tempo, armazenadas a 4°C. Resultados representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido

de pós-teste de Turkey, *p < 0,05; **p < 0,01 ***p<0,001 em relação ao primeiro dia de análise. 57

Figura 16 - Gráficos correspondentes ao diâmetro (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (C) das NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25% analisadas após 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de sua produção, armazenadas à 30°C. Resultados representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Turkey, *p < 0,05; **p < 0,01 ***p<0,001 em relação ao primeiro dia de análise. 60

Figura 17 - Eficiência de complexação de NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25 %. 62

Figura 18 - Eficiência de descomplexação de NLS-PEIs 0,15 e 0,25 % em presença de heparina. 63

Figura 19 - Avaliação da estabilidade do siRNA complexado às NLS-PEIs em condições séricas. 64

Figura 20 - Curva de crescimento celular de células HaCaT. 66

Figura 21 - Viabilidade celular das NLS-PEIs em queratinócitos (HaCaT), com 4 h (A) e 24 h (B) de tratamento. Resultados de viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. 68

Figura 22 - Viabilidade celular das NLS-PEIs em fibroblastos (3T3), com 4 h (A) e 24 h (B) de tratamento. Resultados de viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. 68

Figura 23 - Viabilidade celular das NLS-PEIs sem/com siRNA em queratinócitos HaCaT (A) e em fibroblastos 3T3 (B) em 24 h de tratamento pelo método de redução da resazurina. Resultados de viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3). 70

Figura 24 - Captação e viabilidade celular; e dot plot representativo do siRNA-Alexa livre, complexo formado entre lipofectamina e o siRNA Alexa e a NLS-PEI e o siRNA-Alexa determinado por citometria de fluxo em céulas HaCaT em 4 h de tratamento (A e C) e 24 h de tratamento (B e D). siRNA-Alexa na concentração final de 40 pmol/poço. Resultados de captação e viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Turkey, ***p<0,001 em relação ao tratamento com lipofectamina. 72

Figura 25 - Captação e viabilidade celular; e dot plot representativo do siRNA-Alexa, complexo formado entre lipofectamina e o siRNA Alexa e a NLS-PEI e o siRNA-Alexa determinado por citometria de fluxo em céulas 3T3 em 4 h de tratamento (A e C) e 24 h de tratamento (B e D). siRNA-Alexa na concentração final de 40 pmol/poço. Resultados de captação e viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via,

seguido de pós-teste de Turkey, ***p<0,001 em relação ao tratamento com lipofectamina. 74

Figura 26 - Fotos representativas da microscopia confocal de queratinócitos HaCaT tratados com siRNA Alexa 647 livre, lipofectaminada e as NLS-PEIs. O núcleo das células foi corado com DAPI (azul) e em vermelho o siRNA-Alexa complexado às nanoestruturas internalizado. 76

Figura 27 - Fotos representativas da microscopia confocal de fibroblastos 3T3 tratados com siRNA Alexa 647 livre, lipofectaminada e as NLS-PEIs. O núcleo das células foi corado com DAPI (azul) e em vermelho o siRNA-Alexa complexado às nanoestruturas internalizado. 77

Figura 28 - Porcentagem de inibição da atividade de Firefly luciferase normalizada por Renilla luciferase após tratamento das células HaCaT com siLuc (siRNA luciferase) e ns-siRNA (siRNA não específico) (100 pmol/1x105 células) complexado com as NLS-PEIs e Lipofectamina. ***p<0,001 e *p<0.05 comparado as células tratadas com complexo siLuc-lipofectamina (100 pmol/1x10^5 células), n=3..... 79

Figura 29 - Fotomicrografias de cortes histológicos sem tratamento (controle), siRNA-FAM livre e tratadas com as NLS-PEIs 0,15% e 0,25% complexadas com siRNA-FAM. Os cortes foram visualizados utilizando um filtro específico para o FAM através de uma objetiva de 10x. Três lotes de cada formulação foram testados, e imagens representativas estão apresentadas..... 81

Figura 30 - Avaliação *in vivo* da citocina inflamatória TNF-α após tratamento com a NLS-PEI complexada com o siTNF-α por ELISA (A) e avaliação do efeito das NLS-PEI complexada com o siTNF-α na normalização do aumento dos níveis do RNAm TNF-α por PCR (B), em modelo de inflamação aguda induzida pelo TPA. Os resultados (n=4) estão apresentados como média ± desvio padrão, avaliados pelo teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Turkey, sendo *p<0,05 em relação ao TPA (controle positivo) e ++<0,01 em relação ao controle negativo. 85

Figura 31 - Avaliação *in vivo* da citocina inflamatória TNF-α após tratamento com a NLS-PEI complexada com o siTNF-α por ELISA (A) e avaliação do efeito das NLS-PEI complexada com o siTNF-α na normalização do aumento dos níveis do RNAm TNF por PCR (B), em modelo de inflamação crônica induzida pelo TPA. Os resultados (n=4) estão apresentados como média ± desvio padrão, avaliados pelo teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Turkey, sendo **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao TPA (controle positivo) e ++p<0,01 em relação ao controle negativo. 87

Figura 32 - Imagens representativas da pele de camundongos *hairless* com inflamação cutânea aguda tratados com: A) Acetona (controle negativo); B) TPA (controle positivo); C) NLS-PEI vazia + TPA; D) NLS-PEI + ns-siRNA + TPA; E) NLS-PEI + siRNA TNF-α + TPA. E pele de camundongos *hairless* com inflamação cutânea crônica tratados com: F) Acetona (controle negativo); G) TPA (controle positivo); H) NLS-PEI vazia + TPA; I) NLS-PEI + ns-siRNA + TPA; J) NLS-PEI + siRNA TNF-α + TPA 89

Figura 33 - Fotomicrografias representativas da pele dorsal de camundongos hairless, inflamação cutânea aguda. Os cortes foram visualizados por microscopia de luz convencional utilizando objetiva de 20X. 90

Figura 34 - Espessura da epiderme dorsal de camundongos. Inflamação cutânea aguda. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n=4). Analise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós teste de Turkey em relação ao controle positivo (TPA) e ao controle negativo (acetona). 91

Figura 35 - Fotomicrografias representativas da pele dorsal de camundongos hairless, inflamação cutânea crônica. Os cortes foram visualizados por microscopia de luz convencional utilizando objetiva de 20X. 92

Figura 36 - Espessura da epiderme da pele dorsal de camundongos. Inflamação cutânea crônica. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n=4 animais por grupo). Analise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós teste de Turkey, +p <0,05 e +++p<0,001 em relação ao controle negativo (acetona) e **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle positivo (TPA) 93

Figura 37 - Cortes histológicos corados pelo método Picrosirius red (20x), sem e com polarização. Evidencia-se em vermelho alaranjado o colágeno tipo I e, em amarelo esverdeado, o colágeno tipo III..... 95

Figura 38 - Médias e desvio padrão dos valores das áreas ocupadas pelo colágeno total, sendo (A) inflamação cutânea aguda e (B) inflamação cutânea crônica. Não foi observada diferença estatistica entre os grupos. 96

Figura 39 - Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes de pele sadias. Grupo controle tratado com PBS e grupo tratado com as NLS-PEI veiculando siRNA Alexa 647. Os cortes foram corados com DAPI para visualização do núcleo (azul). Objetiva de 63X. 98

Figura 40 - Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes de pele tratadas com TPA. Grupo controle tratado com PBS e grupo tratado com as NLS-PEI veiculando siRNA Alexa 647. Os cortes foram corados com DAPI para visualização do núcleo celular (azul). Objetiva de 63X. 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade em % dos constituintes utilizados na otimização do processo de produção das NLS. 26

Tabela 2 - Quantidade em % dos constituintes utilizados na otimização do processo de produção das NLS. 27

Tabela 3 - Diâmetro médio (nm), Índice de Polidispersão (PdI) e Potencial Zeta (mV) das formulações estudadas seguidas de seu respectivo Desvio Padrão entre parênteses, n=3. 45

Tabela 4 - Diâmetro médio (nm), Indice de Polidispersão (PdI) e Potencial Zeta (mV) das formulações estudadas seguidas de seu respectivo Desvio Padrão (DP) entre parênteses. 49

Tabela 5 - Resultados correspondentes ao diâmetro seguido do desvio padrão entre parênteses e concentração das NLSs analisadas por NTA. 51

Tabela 6 - Parâmetros de fusão e índice de recristalização (IR) dos lipídeos e das NLS-PEIs. 55

Tabela 7 - Valores correspondentes à entalpia de fusão (ΔH J/g), ponto de fusão (PF °C) e índice de recristalização (IR %) das NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25% analisadas após 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de sua produção, armazenadas a 4°C. 59

Tabela 8 - Valores correspondentes à entalpia de fusão (ΔH J/g), ponto de fusão (PF °C) e índice de recristalização (IR %) das NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25% analisadas após 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de sua produção, armazenadas a 30°C. 61

Tabela 9 - Concentração de NLSs na diluição 1:400 (HaCaT) e 1:800 (3T3). 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	*Atomic force microscopy*
Ago-2	Argonauta-2
BSA	Albumina de soro bovino
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão ética no uso de animais
DAPI	4’6’-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpiroarbonato
DLS	*Dynamic Light Scattering*
DMEM	*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DSC	*Differential scanning calorimetry*
dsRNA	*Double stand* RNA
EC	Estrato córneo
ELISA	*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
FA	Fase aquosa
FAM	Carboxifluoresceína
FCFRP-USP	Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
FL	Firefly luciferase
FO	Fase oleosa
GADPH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
H&E	Hematoxilina & Eosina
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IR	Indice de recristalização
miRNA	microRNA
N_2	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotideo de nicotinamida e adenina

NLS	Nanopartícula lipídica sólida
NLS-PEI 0%	Nanopartícula híbrida polimérico-lipídica com 0% w/w de PEI
NLS-PEI 0,15%	Nanopartícula híbrida polimérico-lipídica com 0,15% w/w de PEI
NLS-PEI 0,25%	Nanopartícula híbrida polimérico-lipídica com 0,25% w/w de PEI
NPL	Nanopartícula híbrida polimérico-lipídica
nm	nanômetro
ns	não específico
NTA	*Nano trafficking Analysis*
OH^-	Radical hidroxila
PBS	Tampão fosfato salino
PdI	Indice de polidispersão
PEI	Polietilenoimina
PEG	Polietilenoglicol
PF	Ponto de fusão
Pré-miRNA	microRNA precursor
Pri-miRNA	microRNA primário
PZ	Potencial Zeta
qRT-PCR	Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real
RISC	RNA *Induced Silencing Complex*
RL	Renilla luciferase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Interferecia por RNA
RNAm	RNA mensageiro
SBF	Soro bovino fetal
shRNA	*short hairpin* RNA
siLuc	siRNA específico para Firefly luciferase
siTNF-α	siRNA específico para TNF-α
siRNA	*small interfering* RNA
TAE	Tris-acetato-EDTA
TNF-α	Fator de necrose tumoral - alfa
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol 13 acetato

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
®	Marca registrada
ΔH	Entalpia de fusão
ºC	Graus Celcius

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE TABELAS vii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS viii

LISTA DE SÍMBOLOS x

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 PELE 1

1.2 TERAPIA GÊNICA – INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi) 5

1.2.1 Desafios para uso terapêutico do siRNA 9

1.2.2 Sistemas de liberação para veiculação do siRNA 10

1.3 NANOPARTÍCULAS HIBRIDAS POLIMÉRICO- LIPÍDICAS (NPL) 16

2 OBJETIVOS 20

2.1 OBJETIVO GERAL: 20

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 20

3 MATERIAL E MÉTODOS 22

3.1 MATERIAL 22

3.1.1 Solventes, reagentes e matérias primas 22

3.1.2 Equipamentos e acessórios 24

3.1.3 Células, tecidos e animais 25

3.2 MÉTODOS 25

3.2.1 Desenvolvimento e caracterização das NLS-PEIs 25
3.2.1.1 Preparo das NLS-PEIs 25
3.2.1.2 Análise do diâmetro médio e distribuição do tamanho das NLS-PEIs 27
3.2.1.3 Determinação da carga superficial das NLS-PEIs 28
3.2.1.4 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) 28
3.2.1.5 Analise por Microscopia de Força Atômica (AFM) 28
3.2.1.6 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) 29
3.2.1.7 Avaliação da estabilidade das NLS-PEIs 29
3.2.1.8 Complexação do siRNA com as NLS-PEIs 29
3.2.1.9 Ensaios em gel de eletroforese 29
3.2.1.9.1 Determinação da capacidade da NLS-PEI complexar o siRNA 30
3.2.1.9.2 Avaliação da descomplexação do siRNA das NLS-PEIs 30
3.2.1.9.3 Avaliação da estabilidade do siRNA complexado a NLS-PEI 31
3.3 ESTUDOS IN VITRO 31
3.3.1 Linhagem celular e cultivo 31
3.3.2 Estudo da Curva de Crescimento de células HaCaT 32
3.3.3 Avaliação da viabilidade celular 32
3.3.4 Estudos de captação celular 32
3.3.4.1 Avaliação da captação celular por Citometria de Fluxo 33
3.3.4.2 Avaliação da captação celular por Microscopia Confocal 33
3.3.5 Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HaCaT pelo siLuc liberado das NLS-PEIs 34
3.3.6 Avaliação da penetração cutânea in vitro das nanopartículas por microscopia de fluorescência 35
3.4 ESTUDOS IN VIVO 35
3.4.1 Animais 35
3.4.2 Indução da inflamação cutânea e esquema terapêutico 36
3.4.3 Avaliação da quantidade de interleucina TNF-α por ELISA 38

3.4.4 Avaliação da eficácia do siRNA TNF-α veiculado pela NLS por meio da quantificação dos níveis do RNAm TNF-α por qRT-PCR 38

3.4.5 Análises histológicas 41

3.4.6 Avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLS-PEI por microscopia confocal de varredura a laser 42

3.5 ANALISE ESTATÍSTICA 42

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 44

4.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NLS-PEIS. 44

4.1.1 Preparo das NLS-PEIs. 44

4.1.2 Análise por rastreamento das NLSs (NTA). 49

4.1.3 Analise por Microscopia de Força Atômica (AFM) 51

4.1.4 Avaliação das NLS-PEIs por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) 53

4.1.5 Avaliação da estabilidade das NLS-PEIs 56

4.1.6 Avaliação da eficiência de complexação do siRNA 62

4.2 ESTUDOS IN VITRO 65

4.2.1 Curva de Crescimento de células HaCaT 65

4.2.2 Ensaio da viabilidade celular em queratinócitos HaCaT e em fibroblastos 3T3 66

4.2.3 Estudos de captação celular 70

4.2.3.1 Avaliação da captação celular por Citometria de Fluxo 70

4.2.3.2 Avaliação da captação celular por Microscopia Confocal 74

4.2.4 Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HaCaT pelo siLuc liberado das NLS-PEIs. 78

4.2.5 Avaliação da penetração cutânea in vitro das nanopartículas por microscopia de fluorescência 80

4.3 ESTUDOS IN VIVO 83

4.3.1 Avaliação da eficácia do siTNF-α veiculado pela NLS-PEIs por meio da quantificação dos níveis de interleucina TNF-α por ELISA e do RNAm TNF-α por qRT-PCR 84

4.3.2 Análises histológicas 88

4.3.3 Avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLS-PEI por microscopia confocal de varredura a laser.....96

5 CONCLUSÕES.....100

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....102

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano correspondendo à cerca de 15% do peso corporal. Entre as múltiplas funções complexas da pele, um de seus papéis principais é o de evitar a invasão de agentes externos, agindo como uma barreira defensiva às ameaças do ambiente exterior. A pele possui mecanismos de defesa que lhe conferem barreiras de proteção física, imunológica e metabólica, a fim de inibir ataques de microorganismos, produtos químicos, radiação ultravioleta (UV) e de partículas. Por outro lado, a pele pode ser utilizada como uma porta de entrada para substâncias terapêuticas, tais como fármacos e vacinas, se os mecanismos que conferem as propriedades de barreira forem entendidos e explorados (BARBIERI et al., 2014; PROW et al., 2011).

De acordo com a Figura 1, a pele humana é estruturada histologicamente em duas camadas: a epiderme e a derme. Logo abaixo da derme existem um tecido de sustentação formado por tecido adiposo chamado hipoderme ou tecido celular subcutâneo (RIBEIRO, 2010).

A epiderme é constituída por um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso, sendo a camada mais externa do tecido cutâneo. É um epitélio versátil, cujas células se multiplicam, diferenciam e renovam periodicamente composto por queratinócitos os quais são elementos dominantes quanto ao número, representando 95% do conjunto das células epidérmicas (LAI-CHONG & MCGRATH, 2013; PROKSCH et al., 2008).

A divisão das células na camada basal origina varias camadas distintas, que à medida que migram para a superfície progressivamente se diferenciam, sofrendo mudanças morfológicas e metabólicas (SMEDEN et al., 2014). Os queratinócitos da epiderme são organizados em camadas, as quais são nomeadas em função da posição ou propriedade estrutural (Figura 1), como:

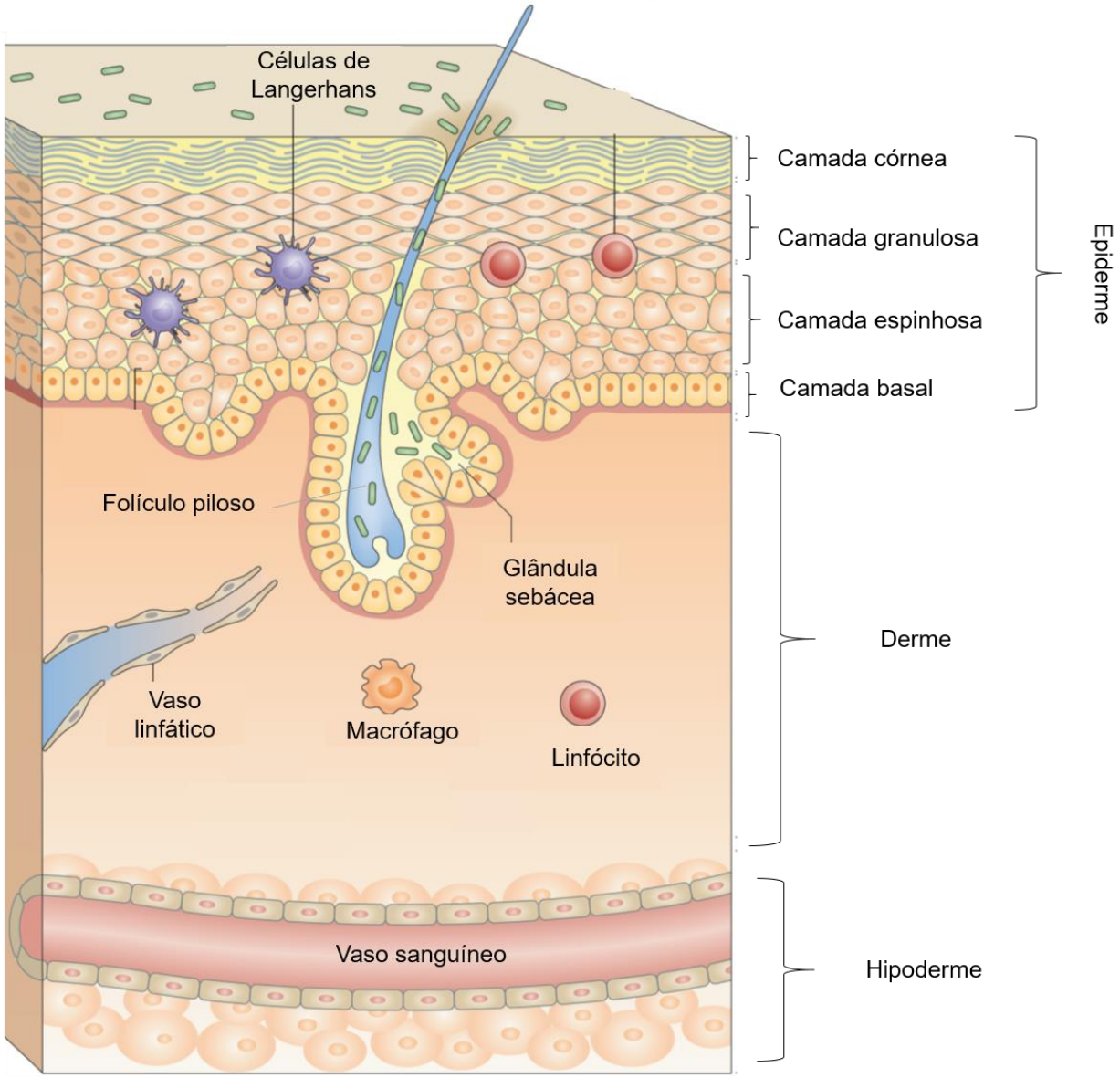
- *Camada basal* composta por celulas proliferativas sobre a junção dermoepidermica;

- *Camada espinhosa* com células que apresentam grande quantidade de filamentos de queratina organizados ao redor do núcleo inseridos na periferia celular associados aos desmossomos, as células mais profundas têm forma poliédrica e as superficiais mais achatadas;

- *Camada granulosa* local de geração de componentes estruturais (grânulos de querato-hialina) e é responsavel pela formação da bicamada lipídica que posteriormente vai formar a barreira epidermica;

- *Camada córnea* formada por células anucleadas achatadas em estagio avançado de degeneração que se dispõem em lamelas num sistema bicompartimental de corneócitos ricos em proteinas rodeados por uma matriz lipídica continua, essa camada é a responsavel pela função de barreira e de proteção (BARBIERI et al., 2014; SMEDEN et al., 2014; PROW et al., 2011).

Figura 1 - Estrutura esquemática da pele (Adaptado de Pasparakis, 2014).



Dessa forma, a queratinização da epiderme, processo de diferenciação celular que leva à formação das células córneas, compreende dois fenômenos: migração

vertical das células surgidas da divisão das células basais e diferenciação destas células, durante sua viagem ascensional para chegar à formação de células córneas. Essas células sofrem esfoliação, ocorrendo dessa forma um deslocamento permanente e repetido de células, que da camada basal atingem gradualmente a superfície epidérmica, para se desprenderem já mortas. Essa diferenciação ocorre em torno de duas semanas para jovens e em torno de 37 dias para pessoas com mais de 50 anos (SMEDEN et al., 2014).

Os lipídeos, presentes no estrato córneo, conferem permeabilidade à água 1000 vezes menor que a maioria das membranas biológicas (SMEDEN et al., 2014). Essa impermeabilidade é considerada um problema, pois se estima que apenas uma pequena porcentagem de material ativo penetra através da pele quando aplicado topicamente (CEVC & VIERL, 2010).

Uma quinta camada, a lúcida é encontrada entre as camadas córnea e granular na palma das mãos e na sola dos pés, conferindo maior espessamento da pele nestas regiões (BARBIERI et al., 2014; PROW et al., 2011).

Dentro da epiderme há varias populações de células, como os melanócitos, que se localizam na camada basal da epiderme, sintetizam o pigmento melanina e transferem para os queratinócitos vizinhos, o que dá cor para a pele e protege contra a radiação UV; células de Langerhans e dendríticas apresentadoras de antígenos, as quais possuem funções imunológicas, e células de Merkel responsáveis pela sensação tátil. A epiderme não possui vasos, os nutrientes e oxigênio chegam à epiderme por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2013; CEVC & VIERL, 2010).

A derme é formada por tecido conjuntivo denso constituído por células e por abundante matriz extracelular, que tem como funções nutrição e sustentação da epiderme. Este tecido de sustentação é atravessado por inúmeros vasos e nervos, onde estão implantados os anexos cutâneos: glândulas sudoríparas e sebáceas, pelos e unhas. Considerada como verdadeiro “reservatório” de água, é suscetível de armazenar, trocar e fornecer massas variadas de água em função das necessidades do organismo. A matriz extracelular é composta por fibras de colágeno e elastina que se banham na substância fundamental, material amorfo formado por água, sais minerais e macromoléculas que são representadas pelos glicosaminoglicanos e glicoproteínas de estrutura. A derme se divide em papilar, que nutre a epiderme por difusão e, em reticular, com vasos sanguíneos de maior calibre e fibras de colágeno e elastina mais

espessas, importantes para a flexibilidade e distensão da pele (ERDŐ et al., 2016; LAI-CHEONG & MCGRATH, 2013).

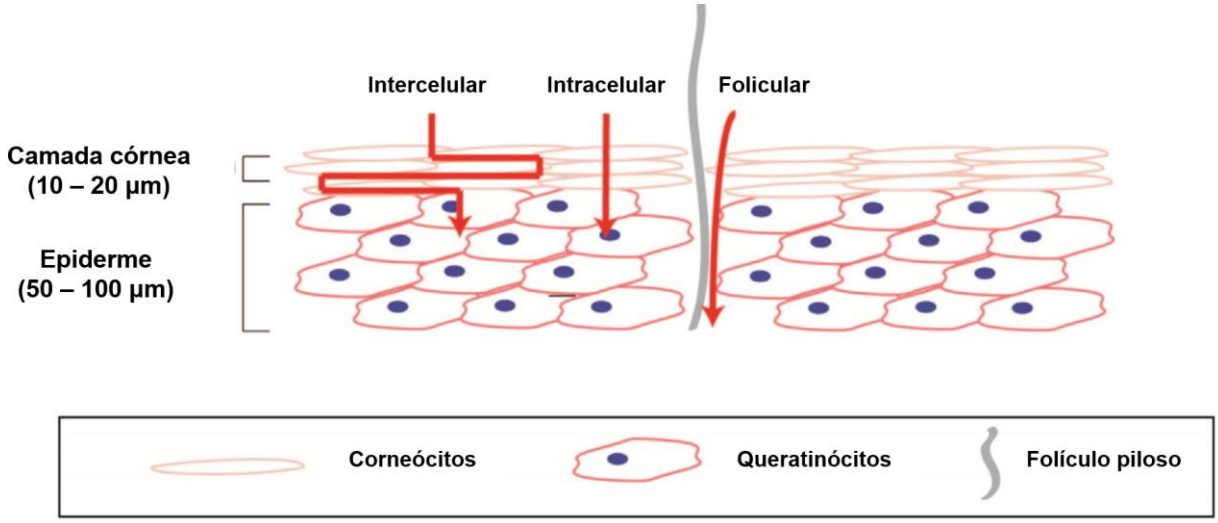
Abaixo da derme está a hipoderme, ou tecido celular subcutâneo, é composta por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas da qual se apoia e é responsável pelo amortecimento de choques físicos e reserva energética (LAI-CHEONG & MCGRATH, 2013).

A aplicação de substâncias ativas na pele ou através dela, abrem diversas possibilidades de uso para produtos farmacêuticos e cosméticos. Além disso, por receber um terço da circulação sanguínea, a pele representa uma rota ideal para tratamento. Todavia, a pele exerce função barreira através do estrato córneo, que é a camada mais externa da pele, a qual influencia a taxa de absorção/penetração de substâncias, juntamente com outros fatores como área de contato (local e extensão), duração da exposição, integridade do estrato córneo e espessura da epiderme; ainda, há aqueles fatores relacionados à molécula como lipofilicidade/hidrofilicidade, peso molecular, concentração e finalmente, tipo da formulação que veicula a molécula (SMEDEN et al., 2014; DELOUISE, 2012; CEVC & VIERL, 2010).

Depois que uma molécula ativa atravessa o estrato córneo, não há outra barreira à difusão nas outras camadas da pele se a molécula não ficar retida ou metabolizada no caminho. A permeação de substâncias através da pele pode ocorrer por difusão da substância ativa através da epiderme intacta ou através dos apêndices da pele, como: folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Esses caminhos pelos quais as moléculas podem atravessar o estrato córneo são: intercelular, intracelular, e folicular, como pode ser observado na Figura 2 (ZAKREWSKY et al., 2015).

O caminho intercelular é o maior responsável pela permeação da maioria dos fármacos (ERDŐ et al., 2016), pois a substância ativa não tem que atravessar os queratinócitos, apenas difunde-se pelas lamelas lipídicas que rodeiam os corneócitos. Na rota intracelular, a substância ativa não apenas difunde-se entre os lipídios como também atravessa os corneócitos preenchidos de queratina e lamelas lipídicas compostas de ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres (PROKSCH et al., 2008). A via folicular acontece através de folículos pilosos associados às glândulas sebáceas, os quais correspondem a 0,1% da área da pele e servem como vias de acesso rápido de curto prazo, assim como as glândulas sudoríparas, para a derme profunda (ZAKREWSKY et al., 2015; ERDŐ et al., 2016).

Figura 2 - Estrutura esquemática das vias de penetração cutânea (Adaptado de Zakrewsky et al., 2015).



Com relação aos perfis de hidrofilicidade e lipofilicidade, a pele é formada de várias camadas que alternam essas propriedades, começando pelo estrato córneo que tem característica lipofílica (13% de água), seguido da epiderme viável (70% de água) e derme com características hidrofílicas. Se uma substância alcançar a derme, será absorvido pela circulação sanguínea local, podendo atingir a circulação sistêmica (CEVC & VIERL, 2010).

Devido a pele possuir grande área de superfície constitui-se o órgão mais acessível do corpo, oferecendo abordagens quanto a modificação de genes. É possível obter-se um tratamento bem controlado de uma área limitada da pele por meio da modificação genética, onde esta região pode ser monitorizada e ter biopsia para melhoria funcional e/ou removida cirurgicamente, se os efeitos secundários indesejados ocorrerem. O sucesso no desenvolvimento da terapia gênica tem um potencial significativo para o tratamento de doenças de pele causada por expressão gênica aberrante, incluindo doenças alérgicas de pele, alopecia, câncer de pele, psoríase, hiperpigmentação e paquioníquia congênita (SEGRE, 2006; CHONG *et al.,* 2013; VICENTINI *et al.,* 2013ª; BARBIERI *et al*., 2014).

1.2 TERAPIA GÊNICA – INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi)

A terapia gênica é definida como a transferência de material genético para células, tecidos ou órgãos com o objetivo de curar uma determinada doença ou melhorar

o estado clínico do paciente; o conceito é simples e envolve a entrega de ácidos nucleicos para células-alvo na tentativa de alterar a produção de uma proteína especifica, levando a modificações na sua expressão e como consequência resultar em um benefício terapêutico (AL-SAIKHAN, 2013; DAVID & PEEBLES, 2008; HE *et al*., 2013; IBRAHEEM, ELAISSARI, FESSI, 2014).

Esta terapia tem o potencial de alterar profundamente a maneira de abordar e tratar doenças crônicas e adquiridas porque permite regular, reparar, substituir, adicionar, deletar ou silenciar uma sequência gênica que é identificada como benéfica ou prejudicial ao funcionamento adequado do organismo. Por isso é importante porque oferece nova opção de tratamento para doenças atualmente incuráveis. A função da administração do gene correto é a de compensar o gene defeituoso contido na célula para, assim, conseguir recuperar sua função normal, eliminando o foco da doença e não apenas seus sintomas (DAVID & PEEBLES, 2008; HE *et al*., 2013).

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

O processo de silenciamento gênico pós-transcricional foi descrito pela primeira vez, no início da década de 90, pelos grupos de Richard Jorgensens e Joseph Mols enquanto tentavam intensificar a coloração púrpura de petúnias por meio da introdução de transgenes responsáveis pela pigmentação (NAPOLI et al., 1990; VAN DER KROL et al., 1990). Entretanto, os resultados obtidos foram flores totalmente brancas ou irregularmente coloridas em decorrência do silenciamento, tanto do transgene, quanto do gene endógeno responsável pela pigmentação. Esse fenômeno foi denominado “co-supressão”. Mais tarde, um efeito semelhante foi encontrado no fungo *Neurospora crassa* e denominado “supressão” (NAPOLI et al., 1990; VAN DER KROL et al., 1990; FRANÇA et al., 2010; SIFUENTES-ROMERO et al., 2011).

No mesmo período, Guo e Kemphues estudavam a função do gene *par-1* no nematódeo *Carnorhabditis elegans* utilizando fitas de RNA antisense e RNA sense (controle negativo) e observaram a inibição da produção da proteína par-1 com a utilização de ambas as fitas (GUO & KEMPHUES, 1995). Enquanto isso, Andrew Fire e Craig Mello (1998) obtiveram resultados semelhantes ao injetarem as fitas senses e

antisense separadamente no nematódeo. Porém, ao injetarem as fitas juntas, observaram que moléculas de fita dupla de RNA (*double strand* RNA – dsRNA) eram mais efetivas que cada fita individualmente na supressão da expressão de um determinado gene com sequência similar àquele dsRNA (FIRE *et al.,* 1998; GARY, PURI & WON, 2007). Este processo foi denominado interferência por RNA (RNAi) e levou Fire & Mello ao prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2006.

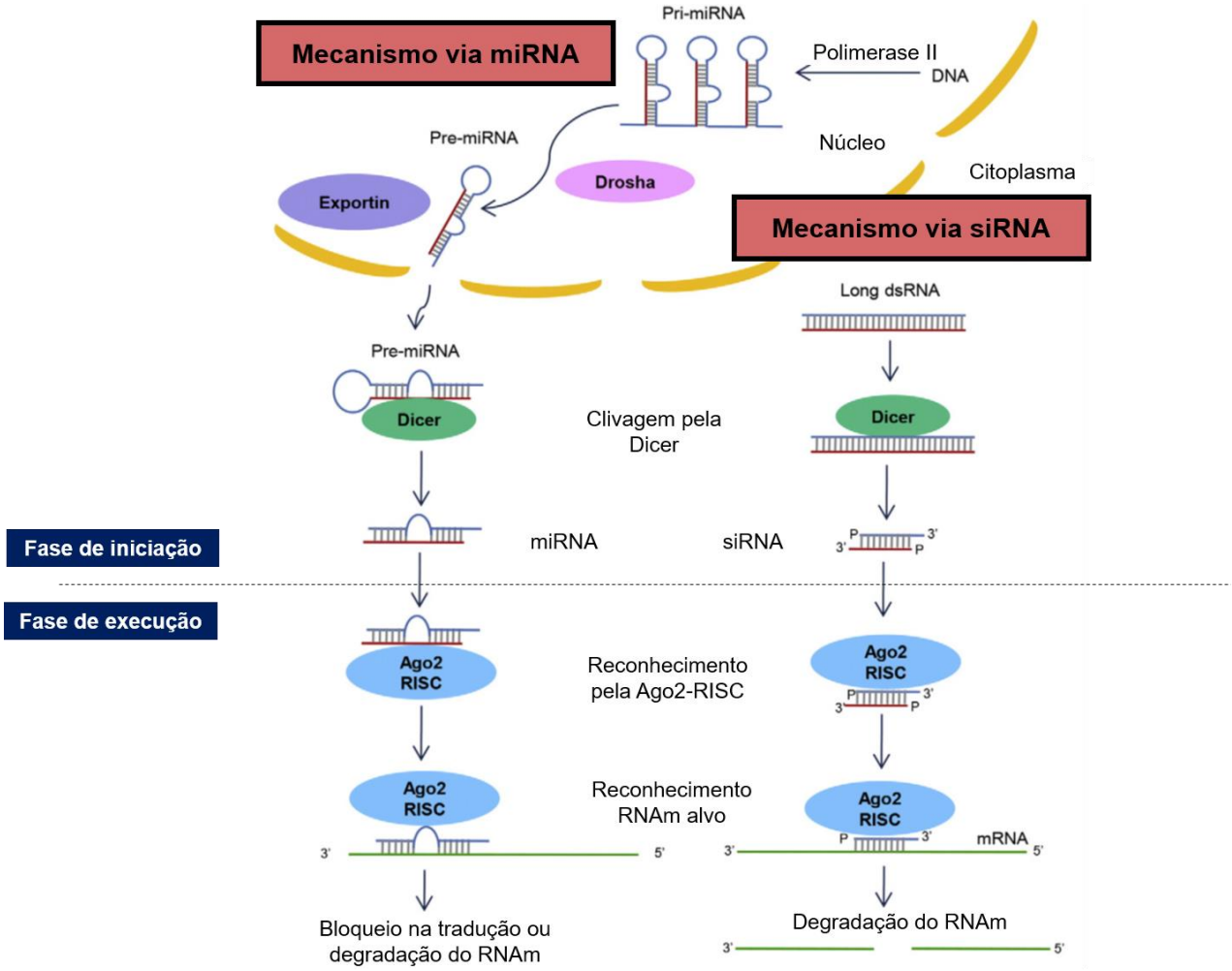
A RNAi ganhou grande atenção e tornou-se um procedimento bastante utilizado para estudar a função dos genes e identificar potenciais genes alvos causadores de doenças. Além de ser uma importante ferramenta de pesquisa, a RNAi é uma grande promessa na terapia gênica para o silenciamento de genes causadores de doenças, aplicando-se, particularmente, para as doenças em que a redução ou supressão do produto de um gene alvo específico possa trazer benefícios terapêuticos (GUO et al., 2010b).

O mecanismo de interferência por RNA pode ser dividido em duas fases distintas: a fase de iniciação, na qual ocorre a produção das moléculas efetoras, as quais podem ser classificadas em relação a sua origem e função em ao menos três categorias: siRNA (*small interfering* RNA), miRNA (microRNA) e shRNA (*short hairpin* RNA); e a fase de execução, na qual ocorre a incorporação das moléculas efetoras em complexos proteicos e a promoção do silenciamento gênico (GELEY; MULLER 2004; DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007).

O siRNA é gerado no citoplasma pela clivagem de dsRNA pela enzima Dicer em pequenos nucleotídeos de aproximadamente 21-23 bases (Figura 3). A geração do miRNA inicia-se no núcleo onde os miRNA primários (pri-RNA) codificados endogenamente são processados em precursor miRNA (pre-miRNA), de aproximadamente 70 pares de bases, contendo uma região dupla fita e uma alça fita simples formando uma estrutura denominada *hairpin*. Estes pre-miRNA são transportados para o citoplasma onde são clivados pela Dicer gerando um miRNA com cerca de 22 nucleotídeos. Na fase de execução, o siRNA e o miRNA são incorporados em complexos proteicos denominados RISC (RNA *Induced Silencing Complex*), do qual a proteína Argonauta 2 (Ago 2) participa. Essa proteína é responsável pela seleção da fita do siRNA ou miRNA que será incorporada ao complexo RISC e apresenta atividade de endonuclease dirigida contra a fita de RNAm alvo. Uma helicase presente neste complexo abre a dupla-fita do siRNA, a fita sense é eliminada e a fita antisense guia o complexo até o RNAm alvo, que é clivado pelo complexo, degradando-o (DE PAULA et al., 2007; VICENTINI et al., 2013b). O siRNA tem uma complementaridade perfeita com

o RNAm alvo, enquanto o miRNA tem normalmente uma sequência imperfeita, o que leva o silenciamento gênico sem a degradação do RNAm (DAVID et al., 2010; GELEY; MULLER, 2004; DE PAULA et al., 2007; HUANG & LIU, 2011).

Figura 3 - Mecanismo de interferência por RNA (Adaptado de Ozcan et al., 2015).



Em células de mamíferos, os siRNAs são tipicamente exógenos, muitas vezes introduzidos na célula por um vírus invasor. O silenciamento de gene pelo siRNA pode ser conseguido por meio de duas estratégias básicas: 1) os vetores virais ou plasmídeos entram no núcleo e são transcritos para produção de sequências curtas de RNA (*hairpin*) as quais são transportadas para o citoplasma e processadas em siRNAs pela enzima Dicer; 2) ou há a introdução de um siRNA sintético (21-23 nucleotídeos) no citoplasma que sofre um processamento direto por meio do complexo multimérico chamado RISC, este convenientemente ignora o mecanismo Dicer (GUO *et al.,* 2011; JACKSON & LINSLEY, 2010; GUZMAN-VILLANUEVA *et al*., 2014).

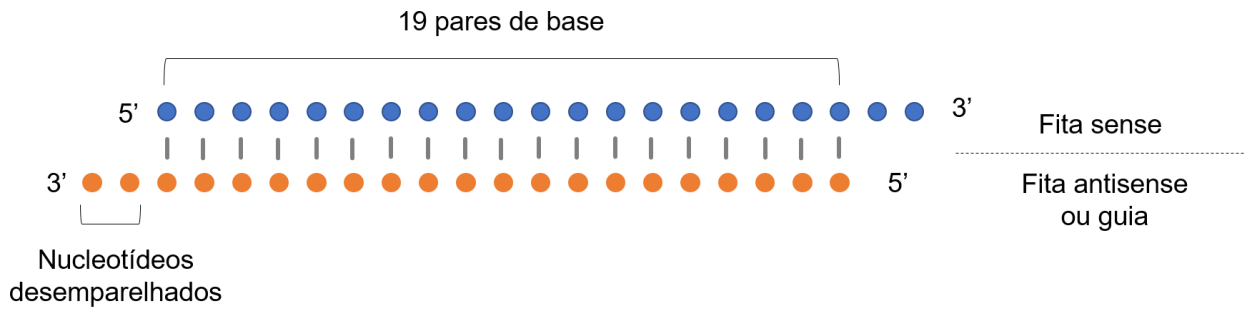
O silenciamento gênico com a utilização de siRNA criou um novo paradigma no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos em relação à terapêutica tradicional com o uso de pequenas moléculas e anticorpos monoclonais. Para projetar uma terapêutica com o uso de siRNA requer-se apenas o conhecimento da sequência do gene alvo de interesse. Além disso, pelo fato do mecanismo de RNAi mediado por siRNA ocorrer no citoplasma, tem-se uma potencial vantagem em relação a outros mecanismos de regulação gênica que necessitam da entrada da molécula efetora no núcleo celular (GUO et al., 2010b). Ademais, o siRNA é especifico e consegue bloquear a expressão somente da proteína de interesse, já como fármaco convencional, devido à similaridade estrutural entre algumas proteínas, o bloqueio não-especifico pode acontecer. Outra vantagem sobre fármacos convencionais é que a inibição da expressão gênica pode ser mais efetiva para o alcance do resultado terapêutico do que o bloqueio da proteína alvo, isto porque uma molécula de RNAm é traduzida em várias cópias de proteína e um siRNA pode silenciar múltiplas cópias de RNAm (BUMCROT et al., 2006; DAKA & PEER, 2012).

Diversos estudos clínicos para terapias à base de siRNA estão sendo conduzidos e os resultados mostram-se promissores reforçando a grande viabilidade dessa nova modalidade (OZCAN et al., 2015).

1.2.1 Desafios para uso terapêutico do siRNA

siRNAs são moléculas de RNA dupla fita estruturalmente bem definida com alto peso molecular (~ 13kDa). Possuem geralmente 19-21 pares de bases, sendo a extremidade 5’ fosforilada e a extremidade 3’ hidroxilada e com 2 nucleotídeos desemparelhados em cada ponta (Figura 4). Para a realização do efeito desejado, é necessário que as moléculas de siRNA atravessem a membrana plasmática e alcancem seu alvo: o interior das células. A membrana plasmática das células é uma estrutura dinâmica com característica lipofílica e grupos de fosfolipídios aniônicos. Como resultado, ela restringe a entrada de moléculas grandes, hidrofílicas e eletricamente carregadas (grupos fosfatos aniônicos), exatamente como as moléculas de RNA, o que faz com que a passagem pela membrana se torne um processo difícil (ALIABADI *et al*., 2012; KHALIL *et al.,* 2006; XU, GANESH, AMIJI, 2012; CHONG *et al*., 2013).

Figura 4 - Estrutura da molécula do siRNA.



As moléculas de siRNA também podem estimular uma resposta do sistema imunológico inato. Várias características podem influenciar a natureza e o grau de imunoestimulação e estas incluem a sequência do siRNA, sua estrutura, modificações químicas e os materiais utilizados na construção dos sistemas de liberação (OZCAN et al., 2015).

Outro desafio da terapêutica com siRNA está relacionado a estabilidade dessas moléculas em fluidos biológicos (OZCAN et al., 2015). Quando veiculadas na forma livre, são quase instantaneamente degradadas pela ação de RNase A, que resulta em uma curta meia-vida, de cerca de 30 min. Dessa forma, as estratégias utilizadas para aumento de estabilidade do siRNA livre é modificação química com o intuito de reduzir a atividade da nuclease e/ou uso de um sistema de liberação que proteja e carreie essa molécula (ALIABADI *et al*., 2012; GUZMAN-VILLANUEVA *et al*., 2014).

Portanto, o sucesso da terapia gênica com siRNA é dependente de um eficiente carreamento e liberação, para que haja a expressão do agente terapêutico nas células-alvo dentro dos tecidos ou órgãos, sendo similar a outras estratégias terapêuticas que envolvem a administração de moléculas biológicas ativas. Com isso, é necessária a utilização de um sistema de liberação adequado para veiculação de tal agente terapêutico que o proteja da degradação *in vivo*, para limitar sua eliminação precoce e para liberar o siRNA nas células específicas para efetivo silenciamento.

1.2.2 Sistemas de liberação para veiculação do siRNA

As barreiras biológicas impostas à terapia a base de siRNA devem ser superadas com o auxílio de sistemas de liberação. Polímeros, lipídeos, proteínas ou peptídeos catiônicos constituem as principais classes de vetores do tipo não-virais para a

veiculação de siRNA e podem ser aplicados na liberação dos genes. Estes tipos de vetores mostram-se promissores devido sua segurança, possibilidade de direcionamento para diferentes alvos celulares por meio de modificações estruturais pela incorporação de ligantes, fácil síntese e baixa resposta imune do organismo quando comparados aos vetores virais (SCHATZLEIN & UCHEGBU, 2006). Os sistemas virais, embora tenham alta eficiência de transfecção, apresentam muitos riscos relacionados às reações imunes e tóxicas além de possível recombinação viral, assim, as questões de segurança são um obstáculo para seu uso (REISCHL; ZIMMER, 2009).

Um sistema carreador ideal para veiculação de siRNA deve ser capaz de (CHROEDER et al., 2010; PECOT et al., 2011; FOLVARI et al., 2015; HATTORI *et al.,* 2006):

- Ultrapassar as barreiras inerentes de cada via de administração;
- Ligar-se às moléculas de siRNA promovendo proteção contra a degradação enzimática;
- Facilitar a captação celular, uma vez que as moléculas de siRNA são incapazes de difundirem passivamente pelas membranas celulares devido a repulsão eletrostática ocasionada pela carga residual negativa do siRNA e da bicamada lipídica;
- Promover o escape endossomal liberando o conteúdo do endossomo no citoplasma celular antes que ocorra a metabolização do siRNA nos lisossomos;
- Ser inerte e não estimular uma reposta imunológica no organismo;
- Liberar as moléculas de siRNA intactas no citoplasma para um eficiente silenciamento gênico.

Os sistemas de liberação não-virais normalmente consistem de complexos formados entre polímeros ou lipídeos catiônicos e siRNA (REISCHL & ZIMMER, 2009). Os lipídeos e polímeros catiônicos formam complexos com siRNA através de interações eletrostáticas de sua carga positiva com a carga negativa do siRNA formando os lipoplexos e os poliplexos, respectivamente. As interações eletrostáticas devem ser suficientemente estáveis para sustentar a complexação do ácido nucleico com o lipídeo ou polímero catiônico durante o seu transporte até a célula alvo protegendo-o da degradação e promovendo a sua internalização celular. A complexação siRNA/carreador catiônico evita os problemas de repulsão pela membrana celular que tem carga residual negativa e diminui o tamanho dos ácidos nucleicos devido à condensação da molécula (LIU et al., 2011; BEYERLE et al., 2011). Os siRNAs também podem ser conjugados com moléculas pequenas (ex. colesterol) e anticorpos. Soma-se a essas alternativas, a possibilidade de veiculação do siRNA em nanopartículas (lipossomas, nanopartículas

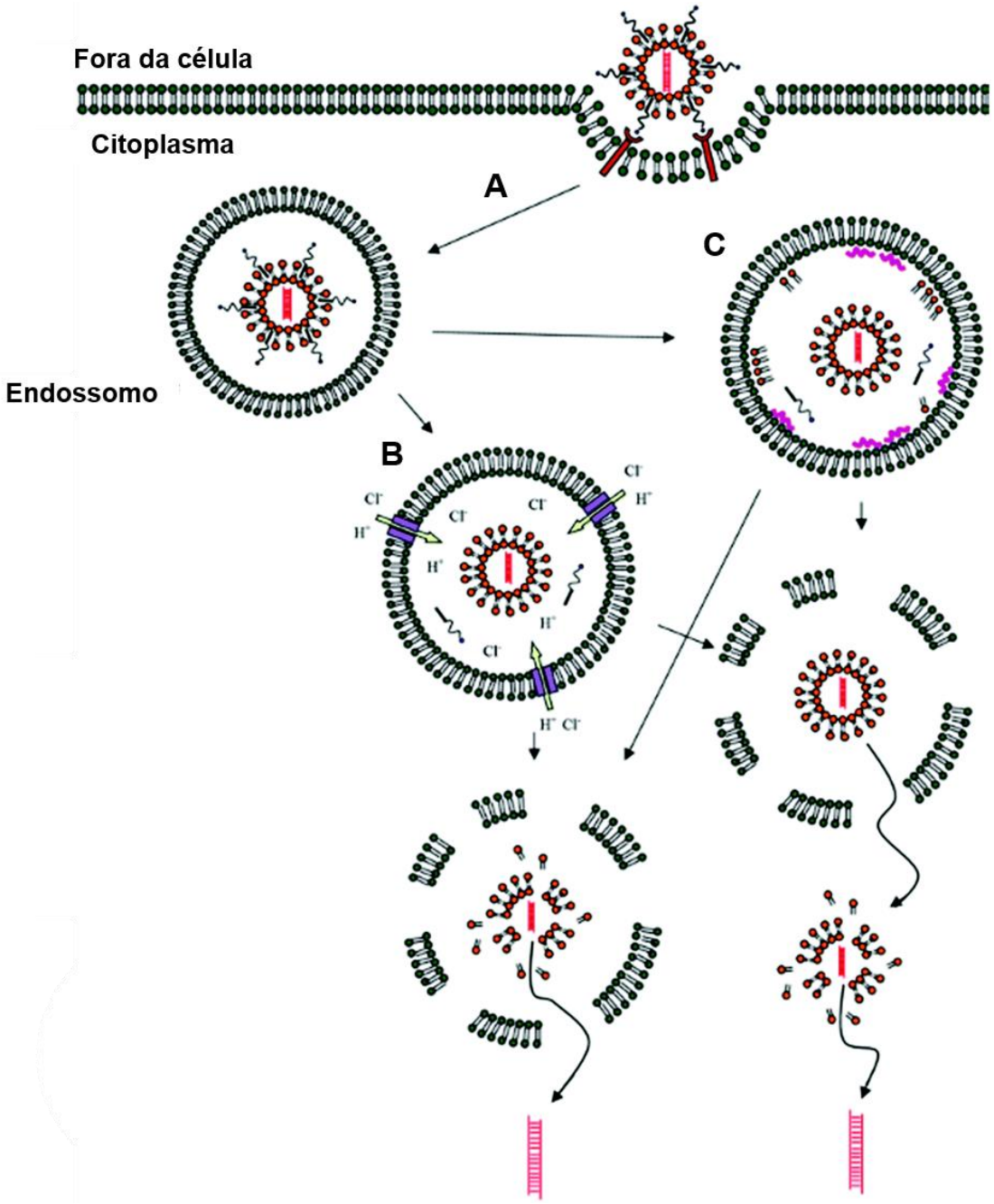
lipídicas, nanopartículas poliméricas, dentre outros), os quais apresentam resultados promissores na promoção da captação celular e silenciamento gênico em diferentes linhagens celulares e tecidos (REISCHL & ZIMMER, 2009; WANG et al., 2010; ZHOU et al., 2014; FOLDVARI et al., 2015).

Os ácidos nucleicos podem ser internalizados nas células por diversas vias de entrada e a preferencialmente utilizada dependerá das características do sistema carreador (tamanho, carga superficial, conformação e presença de ligantes) e da linhagem celular (SAHAY et al., 2010; VERCAUTEREN et al., 2012). A principal via de entrada do siRNA na célula é por endocitose (SCHROEDER et al., 2012) (Figura 5). Foi proposto que o escape endossomal de complexos internalizados por endocitose mediada por clatrina ocorre pela desestabilização da membrana endossomal pela presença dos lipídeos presentes nestes complexos. Caso esta desestabilização não ocorra, o conteúdo não será liberado no citoplasma e ocorrerá a sua degradação lisossomal. Na endocitose mediada por caveolina, o escape endossomal ocorre principalmente pela ruptura osmótica do endossomo num processo denominado “efeito esponja de prótons” (REJMAN et al., 2006). Assim, o complexo precisa ter características adequadas para que ocorra o escape endossomal (WAN et al., 2013).

O tamanho de partícula adequado depende do seu campo de aplicação, por exemplo, para obter uma acumulação passiva de partículas nas regiões tumorais, partículas com diâmetro menor que 200 nm é desejado. Em geral, as partículas com diâmetro médio de até 500 nm podem ser captadas pelas células alvo por endocitose. Dessa forma, no desenvolvimento de sistema de liberação para siRNA, partículas nanométricas são requeridas (REISCHL; ZIMMER, 2009).

O siRNA pode ser administrado sistêmica ou localmente. A administração sistêmica de siRNA deve lidar com diversos desafios além dos inerentes da aplicação de siRNA, como interação do siRNA com componentes do sangue, depuração renal e permeação dentro do tecido, além de problemas de toxicidade em tecidos não-alvo (PEER & LIEBERMAN, 2011; SARET et al., 2015). A administração local pode superar estes desafios e apresenta várias vantagens como possibilitar administração de doses menores, permitir liberação local e diminuir a imunoestimulação (CONDE et al., 2015; VICENTINI et al., 2013b).

Figura 5 - Esquematização do escape endossomal: (A) endossomo, (B) escape endossomal por desestabilização da membrana do endossomo, (C) escape endossomal pelo “efeito esponja de prótons” (Adaptado de Wan et al., 2013).



No que diz respeito a desordens relacionadas com a pele, tais como psoríase, dermatite atópica e doenças vesiculares adquiridas, a terapia à base de siRNA é uma forma de tratamento interessante uma vez que a pele é um órgão com elevada área superficial, de fácil acesso, não-invasiva, além de permitir o tratamento local destas doenças (GEUSENS *et al.,* 2009, VICENTINI *et al.,* 2013a, b).

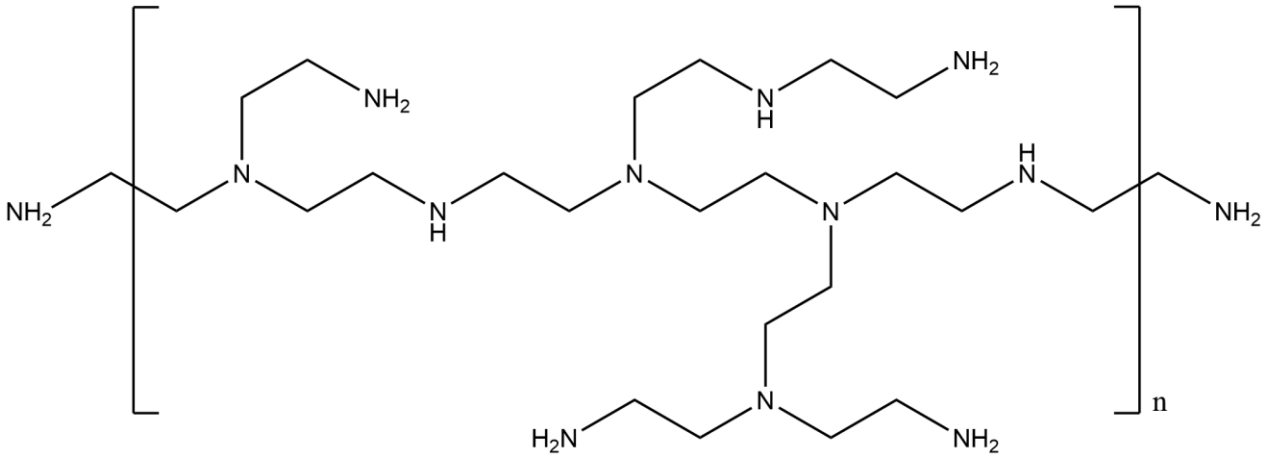
Os sistemas de liberação de fármacos e a Nanotecnologia Farmacêutica apresentam efetivas estratégias para a administração de siRNA pela via tópica. Geusens e colaboradores (2009) sintetizaram e caracterizaram lipossomas ultra deformáveis contendo DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano) e colato de sódio, complexados com siRNA e investigaram a eficiência deste sistema de liberação *in vitro* em culturas primárias de melanócitos epidérmicos humanos. Kigasawa e colaboradores (2010), estudaram a permeação cutânea de siRNA associada a técnica de iontoforese. Adicionalmente, investigaram o efeito do siRNA nos níveis de interleucina-10, a qual encontra-se elevada na dermatite atópica, verificando a diminuição desta citocina com o tratamento sugerido.

Chong e coautores (2013), avaliaram o potencial de microagulhas de aço inoxidável revestidas de siRNA como um meio para liberá-lo na região alvo, a epiderme. Este foi o primeiro estudo a explorar a utilidade desse sistema para liberação de siRNA e observaram a deposição de siRNA dentro da pele e o silenciamento *in vivo* do gene (Luciferase/GFP) em questão. Já Vicentini e colaboradores (2013b) avaliaram nanodispersões de fases liquidas cristalinas como vetores não-virais, para liberação de siRNA na pele utilizando-se do polímero catiônico polietilenoimina (PEI) e do lipídeo catiônico oleilâmina (OAM) para complexação com siRNA. Os autores verificaram que os sistemas propostos aumentaram a penetração do siRNA na pele de camundongos *hairless* e promoveram a redução dos níveis da proteína modelo GAPDH sem causar irritação cutânea. Depieri et al., (2016) avaliaram esse mesmo sistema de aplicação tópica em modelo *in vivo* de psoríase e silenciaram a citocina IL-6. Ainda com um sistema de liberação semelhante, Petrilli e colaboradores (2016) funcionalizaram essas nanodispersões de fases liquidas cristalinas com peptídeos célula penetrantes e silenciaram a citocina TNF-α em modelo *in vivo* de inflamação tópica aguda induzida por derivado de forbol.

Dentre os polímeros carregados positivamente empregados na construção de carreadores não-virais, um dos mais utilizados é a polietilenoimina (PEI) (Figura 6). A PEI é um polímero sintético hidrossolúvel com elevada carga residual positiva em pH fisiológico devido aos grupamentos amino protonáveis em cada terceira posição (GUNTHER et al., 2011). Este polímero apresenta alta capacidade de se complexar com ácidos nucleicos por meio de interações eletrostáticas, promovendo a condensação da sua estrutura, com isso, diminui o seu tamanho e neutraliza a carga negativa, favorecendo a entrada na célula através da membrana celular e facilitando o escape

endossomal pelo “efeito esponja de prótons” (GUNTHER et al., 2011, YIN et al., 2014; GUO et al., 2010b).

Figura 6 - Estrutura química do PEI ramificado.



Há disponível no mercado o polímero catiônico PEI com diferentes massas moleculares e na forma linear ou ramificada, sendo as formas ramificada e de baixo peso molecular as mais indicadas para uma efetiva liberação intracelular. Estudos comparativos entre nanopartículas preparadas com PEI na forma linear ou ramificada mostraram que a forma ramificada foi mais adequada, pois produziu partículas mais estáveis, carregadas positivamente, que promoveram uma alta captação celular do siRNA e resultaram em um silenciamento gênico mais efetivo (KWOK & HART, 2011). O PEI ramificado de 25 kDa e o de 22 kDa são os mais eficientes. Porém, estes PEIs apresentam certa toxicidade celular (GUNTHER et al., 2011; LIU et al., 2011).

Vários sistemas com base lipídica foram desenvolvidos para veiculação de siRNA. Variações na composição dos lipídeos e nas propriedades estruturais das nanopartículas permitem a entrega especifica do siRNA, além de influenciar sua liberação após a internalização celular (KAPOOR et al., 2012). As nanopartículas lipídicas solidas (NLS) são sistemas compostos por substâncias fisiologicamente toleradas e que já possuem aprovação para aplicação farmacológica em seres humanos. Seus componentes apresentam baixa citotoxicidade e possibilitam a obtenção de nanopartículas sem o uso de solventes. Além disso, são passiveis de esterilização e sua produção pode ser feita em larga escala o que é interessante para produção industrial (ASSIS et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; FRICKER et al., 2010; HU et al., 2008; MANDAL et al., 2013; MÜLLER et al., 2008).

Diante disso, com o intuito de reduzir a toxicidade do PEI e aproveitar suas qualidades para terapia gênica e concomitantemente utilizar-se das vantagens das NLSs, propôs-se a síntese de uma nanopartícula lipídica associada a esse polímero. A literatura atual mostra algumas propostas de sistemas de liberação tópica de siRNA. Entretanto, o uso de nanopartículas híbridas polimérico-lipídicas para complexação e liberação de siRNA na pele para o tratamento de doenças cutâneas, ainda é pouco explorado, o que demonstra o caráter inovador deste trabalho.

1.3 NANOPARTÍCULAS HIBRIDAS POLIMÉRICO- LIPÍDICAS (NPL)

As NPLs são um sistema nanométrico emergente de administração de fármacos, feitas de polímeros e lipídios, compreendendo vantagens de ambos os materiais. As NPLs são sólidas à temperatura corpórea, semelhante às NLSs, mas diferente de nanopartículas essencialmente lipídicas, como os lipossomas que consistem de um núcleo aquoso rodeado por uma bicamada lipídica (WU, 2016; HADINOTO et al., 2013; ZHANG & ZHANG, 2010).

A coexistência de polímeros e lipídeos possuindo propriedades diferentes no mesmo material, como hidrofobicidade e a solubilidade em água, confere uma capacidade versátil às NPLs de encapsular diversos tipos de compostos. Em comparação com outros tipos de nanocarreadores, a NPL apresenta uma série de vantagens próprias, incluindo (1) ampla seleção de polímeros e lipídios biocompatíveis e inúmeras combinações lipídico-poliméricas, (2) fácil produção (3) superior capacidade de co-encapsulamento de agentes terapêuticos e de imagem com diferentes propriedades (WU, 2016). Além disso, em uma NPLs bem desenvolvida a porção polimérica encapsula fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis e fornece estruturas robustas, enquanto que a porção lipídica funciona como uma blindagem biocompatível, passível de modificações na superfície, funciona como uma barreira que evita o escape de fármacos encapsulados e oferece aumento na estabilidade sérica quando utilizado lipídeos PEGlados (CHEOW & HADINOTO, 2011).

Várias moléculas bioativas, como fármacos, genes, proteínas e moléculas com atividade funcionalizadora podem ser encapsuladas, adsorvidas ou ligadas de forma covalente nesse sistema híbrido. As escolhas comuns de polímeros incluem ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), policaprolactona (PCL), dextrano ou albumina devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e uso prévio em produtos aprovados. Os lipídeos utilizados são geralmente lipídeos conjugado ao polietilenoglicol

(PEG), ácidos graxos, lecitina, fosfolípidos zwitterionicos, catiônicos, aniônicos e neutros, como a lecitina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamónio-propano (DPTAP), 1,2-dioleoil-3-trimetilamónio-propano (DOTAP) ou 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-hosocetanolâmina (DOPE) (ZHANG et al, 2016; MANDAL et al., 2013).

A NPL foi inicialmente relatada no início dos anos 2000 para solucionar problemas de encapsulação de fármacos iônicos hidrossolúveis em matriz lipídica com o intuito de se encapsular adequadamente e promover a liberação sustentada desses medicamentos (WONG et al., 2004). Desde então, várias formulações de NPL têm sido desenvolvidas para encapsular quimioterápicos (ZHANG et al., 2016; SENGEL-TURK & CANAN HASCICEK, 2017), antibióticos (CHEOW & HADINOTO, 2011), co-encapsulação de um quimioterápico e um quimiossensibilizador (WONG et al., 2006), co-encapsulação com efeito sinérgico de dois quimioterápicos (LI et al., 2017; PRASAD et al., 2012) bupivacaína para anestesia local (MA et al., 2017), nicotina para tratar dependência química (ZHAO et al., 2017). As formulações de NPL também foram desenvolvidas para encapsular moléculas biologicamente ativas para terapia gênica e imunoterapia, incluindo siRNA (SHI et al., 2011; SHI et al., 2014) ou siRNA com um quimioterápico (ZHAO et al., 2015). É descrito que as NPLs aumentaram a eficiência de encapsulação, a liberação controlada, a absorção e a captação de fármacos quando comparados aos nanocarreadores lipídicos ou poliméricos isolados (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al, 2016).

As formulações de NPL relatadas podem ser divididas em duas categorias principais (Figura 7) (MANDAL et al., 2013; WU, 2016):

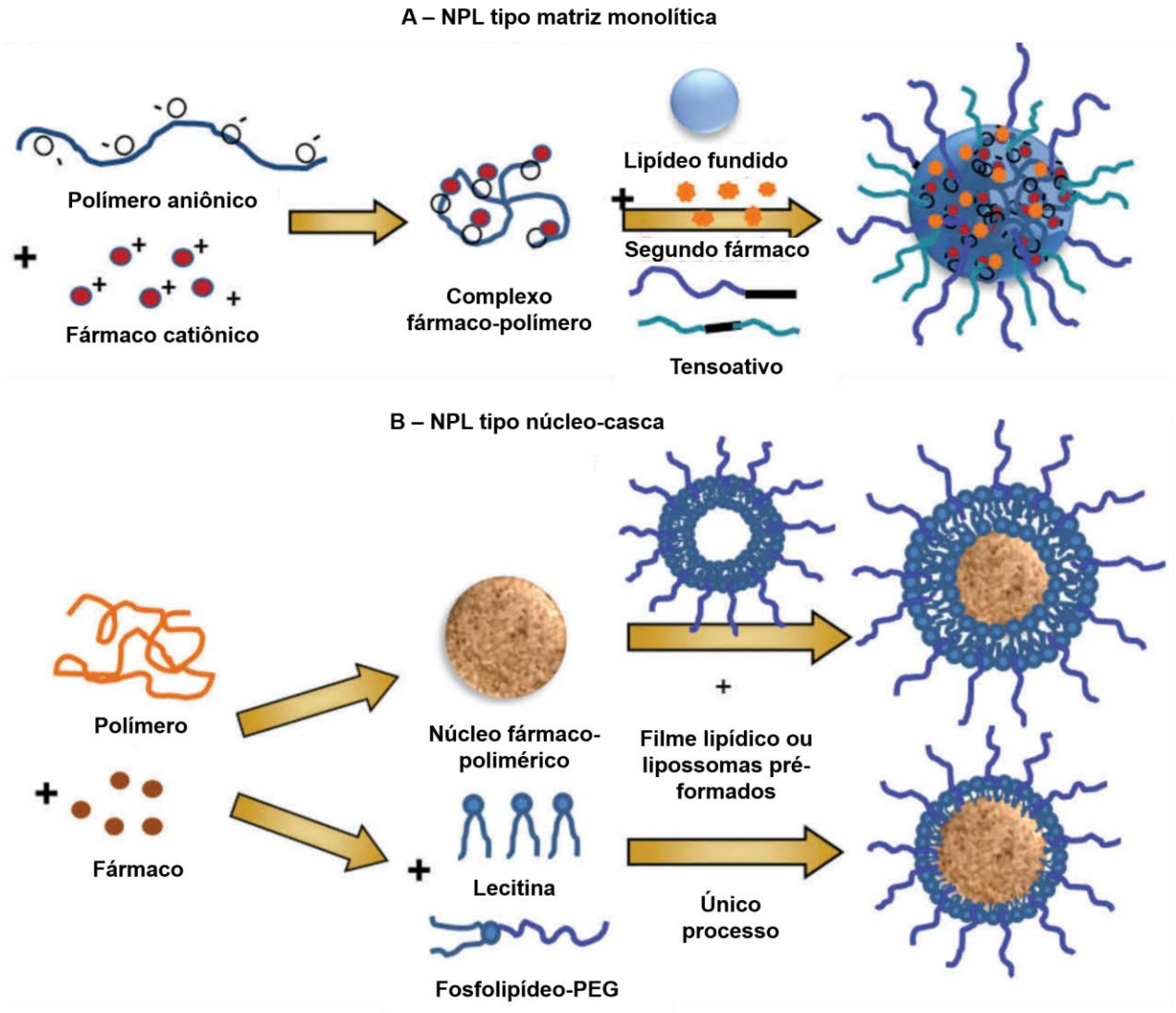
- NPL de matriz monolítica, onde o polímero e os fármacos são distribuídos de forma homogênea na matriz lipídica sólida, são também conhecidas como nanopartículas mistas lipídico-poliméricas (ZHANG et al, 2016; PRASAD et al., 2013; PRASAD et al., 2012; ZHANG et al., 2008; WONG et al., 2006; WONG et al., 2004).

- NPL núcleo-casca, onde o núcleo polimérico contendo fármaco é coberto por uma camada de fosfolipídio, são também conhecidas como nanopartículas lipídico-poliméricas (HADINOTO et al., 2013; CHEOW & HADINOTO, 2011; SHI et al., 2011; ZHANG & ZHANG, 2010; SALVADOR-MORALES et al., 2009).

Nas NPLs de matriz monolítica, geralmente utiliza-se polímeros aniônicos ou catiônicos para se complexarem com fármacos de carga oposta e dessa forma aumentar sua eficiência de encapsulação. Para carregar um fármaco catiônico, por exemplo, doxorrubicina HCl ou verapamil HCl, foi utilizado um polímero aniônico, tal como sulfato

de dextrana ou polímero de óleo de soja, para neutralizar a carga do fármaco e dessa forma incorporá-lo na matriz lipídica, utilizando Tween 80 ou Pluronic 188 como tensoativos. O método de produção empregado para esse tipo de nanopartícula envolve microemulsificaçao a quente empregado alto cisalhamento por meio de Ultra-Turrax ou Ultrassom de ponta, utilizando pouco ou nenhum solvente orgânico. Em caso de co-encapsulação os fármacos podem ser não-iônicos ou hidrofóbicos, além disso existe a possibilidade de produção de nanopartículas furtivas a partir de lipídeos PEGlados (MANDAL et al., 2013; WU, 2016; ZHANG et al., 2016).

Figura 7 - Ilustração esquemática da estrutura e preparação dos principais tipos de NPLs. (A) matriz monolítica e (B) núcleo-casca (Adaptado de WU, 2016).



A NPL núcleo-casca utiliza a vantagem do núcleo polimérico para liberação do fármaco sustentada e camada (mono ou bi) lipídica semelhante a superfície lipossomal. As cadeias de PEG também podem ser conjugadas na superfície para obtenção de nanopartículas furtivas. Essa NPL normalmente é preparada por um método que envolve duas etapas: O polímero (PLGA, por exemplo) e o fármaco são solubilizados juntos em um solvente orgânico e por emulsificação por evaporação do solvente tem-se a formação do núcleo polimérico contendo o fármaco encapsulado. Esse núcleo polimérico então é misturado com filme lipídico ou lipossomas pré-formados e reidratados para formar as bicamadas lipídicas (MANDAL et al., 2013; WU, 2016). É descrito também a produção dessas nanopartículas em um só processo, por nanopreciptação (MA et al., 2017; LI et al., 2017; ZHANG et al., 2008).

Ao longo dos últimos, sistemas de liberação à base de NPLs tem-se desenvolvido rapidamente para alcançar uma terapia eficaz e segura para uso clinico. Todas as formulações de NPL relatadas são feitas por métodos de preparação simples, utilizando-se de polímeros, lipídios e tensoativos que foram utilizados em produtos farmacêuticos aprovados, ou geralmente considerados como seguros. Dessa forma, o presente trabalho propõe um estudo sistemático na busca dos componentes e técnica de preparo ideal para o desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da atividade de um sistema nanoparticulado hibrido polimérico lipídico do tipo matriz monolítica, utilizando-se de PEI como polímero catiônico e matriz lipidica (NLS-PEI) para complexação ao siRNA com baixo potencial irritativo e alta estabilidade, o qual permita sua administração para tratamento de doenças cutâneas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolvimento farmacotécnico e caracterização de NLS-PEIs como sistemas de liberação tópica para siRNA e avaliação de seu potencial na terapia gênica de doenças cutâneas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obtenção das NLS-PEIs;
- Caracterização físico-química:
  - Análise do diâmetro médio e distribuição do tamanho das NLS-PEIs por espalhamento dinâmico de luz (DLS);
  - Determinação da carga superficial das NLS-PEIs por mobilidade eletroforética;
  - Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA);
  - Analise por Microscopia de Força Atômica (AFM);
  - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
  - Avaliação da estabilidade das NLS-PEIs por DLS e DSC;
  - Determinação da capacidade da NLS-PEI complexar e liberar o siRNA de forma intacta;
  - Avaliação da estabilidade do siRNA complexado a NLS-PEI;
- Avaliação da viabilidade celular das NLS-PEIs utilizando-se células de queratinócitos da linhagem HaCaT e células de fibroblastos da linhagem 3T3, pelo ensaio de redução da Rezasurina;
- Avaliação da captação *in vitro* das NLS-PEIs associadas ao siRNA utilizando-se células de queratinócitos da linhagem HaCaT e células de fibroblastos da linhagem 3T3 por citometria de fluxo e microscopia confocal;
- Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HaCaT pelo siLuc liberado das NLS-PEIs
- Avaliação da penetração cutânea *in vitro* do siRNA complexado nas NLS-PEIs por microscopia de fluorescência;
- Avaliação da eficácia de silenciamento do TNF-α *in vivo* em modelo de inflamação tópica aguda e crônica após tratamento com a NLS-PEI veiculando siTNF-α;

- Avaliação da penetração cutânea *in vivo* do siRNA complexado as NLS-PEIs por microscopia confocal de varredura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Solventes, reagentes e matérias primas

- Gliceril dibehenato (Compritol® 888 ATO) – Amostra doada pela Gattefossé do Brasil (Barueri, SP, Brasil);
- Triglicerídeo de ácido miristílico (Dynasan 114 Pulver) – Amostra doada pela Cremer Oleo GmbH & Co.KG (Hamburg, Alemanha);
- Polietilenoimina – Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EUA);
- Polaxamer 407 – Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EUA);
- Polaxamer 188 – Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, EUA);
- siRNA não específico (ns-siRNA) – Silencer Negative Control #1 siRNA (#AM4635) Ambion (Austin, TX, USA) – *Applied Biosystems*,
- siRNA-FAM – Silencer 6-carboxyfluorescein (FAM) GADPH siRNA (#AM4650) Ambion (Austin, TX, USA) – *Applied Biosystems*,
- siLuc (sense: GAUUAUGUCCGGUUAUGUACG, antisense: UACAUAACCGGACAUAAUCGG) – Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA);
- Luciferase Reporter Assay System (Promega, Holanda);
- Lipofectamina 2000 – Life Technologies (Paisley, Reino Unido);
- Vetor pCMV-Luc [expressão de Firefly Luciferase (FL)] – PlasmidFactory (Biefeld, Alemanha);
- Vetor pGL4.74 [HrLUC/tk] [expressão de Renilla luciferase (RL)] – Promega (Leiden – Holanda);
- Dual Luciferase Reporter Assay System kit – Promega (Leiden – Holanda);
- Albumina do soro bovino (BSA) – MP Biomedical (Santa Ana, CA, EUA);
- Reagente de Bradford - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- OPTI-MEM I + GLUTAMAX™ I 1X (Optimem) Ref 51985-026: Life Technologies (Paisley, Reino Unido);
- Meio de Cultura DMEM – Dulbecco´s Modified Eagle Medium – *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- 12-O-tetradecanoil-forbol13-acetato (TPA) - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- Brometo de etídeo - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);

- 4’6’ – diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Prod Nº 1306) – Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA);
- Dietilpirocarbonato (DEPC) - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- Fluoromount - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- Iodeto de propídeo - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- Paraformaldeído - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- Solução de antibiótico e antimicótico composto por 10.000 unidade de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- Tripsina-EDTA (0,25%) - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- Dimetilsulfóxido, etanol, fosfato monossódico, fosfato dissódico, fosfato de sódio e xilol – Synth (Diadema, SP, Brasil);
- Soro bovino fetal inativado - Gibco® (Carlsbad, CA, EUA);
- Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, siRNA controle – Silencer Negative Control #1 siRNA (#AM4635) sintentizado - Ambion (Austin, TX, USA) – *Applied Biosystems*;
- siRNA Tnf (Silencer® Select Pre-designed siRNA) - Ambion (Austin, TX, USA) – *Applied Biosystems*;
- RNAlater® Stabilization Solution - Ambion (Austin, TX, USA) – *Applied Biosystems*;
- Taqman® Gene Expression Assay - Applied Biosystems (Foster City, CA, USA);
- Primers Gadph (Mn.PT.39a.1), Tnf (Mn.PT.58.12575861) e Actb (Mm.PT.58.28904620.g) – Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa, EUA);
- siRNA Controle Alexa 647 Qiagen (Germantown, MD, EUA);
- Tissue-Tec® OCT^{TM} Compound – Sakura Fineteke (Torrance, CA, EUA);
- Tris (hidroximetil) aminometano – Merck KGaA (Alemanha);
- UltraPureTM Agarose – Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA);
- Resazurin sodium salt - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- Coquetel Inibidor de protease - *Sigma Aldrich* Co. (St Louis, MO, EUA);
- Kit Elisa para quantificação da interleucina TNF-α para camundongos – Affymetrix Ebioscience (EUA);
- Agua ultrapura obtida de sistema MiliQ – Merck Millipore (Alemanha);
- Parafina Histosec® (Merck, Alemanha).

3.1.2 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica – Acculab (Arvada, CO, EUA);
- Célula de difusão de Franz modificada *in vitro* vertical – Hanson Instruments (EUA);
- Dermatômetro Nouvag AG (Suíça);
- Liofilizador Freezone 2.5 – Labconco (EUA);
- Leitor de microplacas Synergy 2 – Biotek Instruments (Winooski, VT, EUA);
- Citômetro de Fluxo BD FACSCalibur® - BD Biosciences (EUA);
- Microscópio Confocal LEICA – TCS SP2; software: LAS-AF; equipado com laser Hene 633 nm (Buffalo Grove, IL, EUA);
- Microscópio óptico equipado com filtro polarizador Axioplan 2 Image Pol – Carl Zeiss (Alemanha);
- Banho termostatizado, Fanem (Guarulhos, SP, Brasil);
- Centrifugas Eppendorf modelo 5430 R e 5810 R – Eppendorf (Alemanha);
- ZetaSizer Nano series, Nano-ZS – Malvern Instruments (Reino Unido);
- Nanosight modelo NS 300 - Malvern Instruments (Reino Unido);
- Agitador mecânico tipo mixer - Ultra-turrax IKA (Campinas, SP, Brasil);
- Medidor de pH – Digimed (São Paulo, SP, Brasil);
- Ultrassom de haste (SONICS - 750 Watt ultrasonic processor / model No: VC(vibra cell) 750)**;**
- Chapa Aquecedora;
- Cuba eletroforética – Biorad;
- Microscópio óptico de fluorescência modelo Axio Imager A1, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha), com software analisador de imagem AxioVision, Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha);
- Micrótomo rotativo manual 820 Spencer Microtome - AO® American Optical (Buffalo, NY, EUA);
- NanoDrop 2000 – Thermo Scientif (Waltham, MA, EUA);
- Sistema de fotodocumentação L-Pix EX – Loccus Biotecnologia (Cotia, SP, Brasil) equipado com software L-PixImage;
- Termociclador Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler – Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA);
- SpectraMax L luminescence microplate reader - Molecula Devices;
- Criostato Leica CM 1850 – Leica Biosystems Inc. (Buffalo Grove, IL, EUA);

- Incubadora;
- Fluxo lâminar;
- Agitador tipo vórtex e magnético;
- Microscópio de varredura da Shimadzu (*Scanning Probe Microscope* - AFM), modelo SPM-9600;
- DSC – Perkin Elmer, Jade DSC.

3.1.3 Células, tecidos e animais

- Células imortalizadas de Queratinócitos Humanos – linhagem HaCaT (Banco de células do Rio de Janeiro) e células de Fibroblastos de camundongos – linhagem BALB/3T3 clone A31 (Banco de células do Rio de Janeiro);
- Amostras de pele frescas retiradas cuidadosamente da parte externa da orelha de porcos (recém abatidos, Frigorifico Olhos d'água, Ipuã, São Paulo) com o auxílio de um bisturi, dermatomizadas numa espessura de 500 µm e armazenadas a -20 ºC, sendo utilizadas dentro de 30 dias;
- Camundongos sem pelo (linhagem HRS/J), com 4 a 6 semanas de idade, pesando entre 20 e 30 gramas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Desenvolvimento e caracterização das NLS-PEIs

3.2.1.1 Preparo das NLS-PEIs

A preparação das nanopartículas foi realizada pelas técnicas de homogeneização a quente empregando alto cisalhamento e/ou ultrassom. A fase lipídica foi composta por Compritol® 888 ATO ou Dynasan® 114 e a fase aquosa composta por tampão Tris-HCl 0,1M, pH 6,5, polímero catiônico PEI (Polietilenoimina) e Poloxamer 407 ou Poloxamer 188, preparada com água livre de RNase (água com dietilpirocarbonato – água DEPC).

A fase aquosa e a fase oleosa foram aquecidas em béqueres separados em banho termostatizado, até a temperatura de fusão do lipídeo: 75 ± 5 °C para o Compritol® 888 ATO e 52 ± 5 °C para o Dynasan®. A fase aquosa foi vertida na fase oleosa e essa emulsão foi dispersa com a ajuda de um homogeneizador de alto cisalhamento (30000 rpm) (Ultra-turrax) e/ou ultrasonicação (Ultrassom de haste). Em

seguida, a dispersão foi resfriada até a temperatura ambiente para a solidificação das partículas e obtenção das NLS-PEIs.

Otimização da formulação

Para otimização da formulação, avaliou-se os lipídeos Compritol® 888 ATO e Dynasan® e os tensoativos o poloxamer 188 e poloxamer 407. Os parâmetros analisados foram o tamanho médio, a distribuição de diâmetro das partículas e o potencial zeta das mesmas.

Diferentes proporções entre os componentes foram estudadas como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade em % dos constituintes utilizados na otimização do processo de produção das NLS.

Formulações	PEI	Compritol® 888 ATO	Dynasan® 114	Poloxamer 188	Poloxamer 407	Fase aquosa
F1	0,00		2,00		1,50	96,50
F2	0,00		2,00	1,50		96,50
F3	1,00		2,00		1,50	95,50
F4	1,00		2,00	1,50		95,50
F5	0,00	2,00			1,50	96,50
F6	0,00	2,00		1,50		96,50
F7	1,00	2,00			1,50	95,50
F8	1,00	2,00		1,50		95,50
F9	1,00	1,00		1,50		96,50
F10	1,00	3,00		1,50		94,50
F11	1,00	4,00		1,50		93,50
F12	1,00	5,00		1,50		92,50
F13	1,00	2,00		0,50		96,50
F14	1,00	2,00		3,00		94,00
F15	1,00	2,00		5,00		92,00

Depois de selecionada a proporção dos componentes para trabalho de acordo com os resultados obtidos, foi otimizado também o tempo de homogeneização no ultra-turrax e/ou ultrassom.

Para a otimização do tempo de homogeneização no ultra-turrax, avaliou-se os tempos 2,5; 5,0; 7,5 e 10 min, mantendo-se as amostras na temperatura de 75 ± 5 ºC. Já na padronização do tempo no ultrassom de agulha, as amostras foram aquecidas a 75 ±

5 ºC e em seguida foram homogeneizadas nos tempos: 10; 20; 30; 40 e 50 min, sob uma amplitude de 40% com frequência de 20 kHz.

Avaliou-se ainda a utilização de ultra-turrax seguido de homogeneização no ultrassom na produção das NLS-PEIs. Para isto, as amostras foram aquecidas a 75 ± 5 ºC, e o tempo de homogeneização do turrax (T) e ultrassom (U) foram variados da seguinte forma: 2,5 min T + 2,5 min U; 2,5 min T + 5 min U; 2,5 min T + 7,5 min U; 2,5 min T + 10 min U; 5 min T + 2,5 min U; 5 min T + 5 min U; 7,5 min T + 2,5 min U; 7,5 min T + 5 min U.

Padronizada e otimizada a produção das nanopartículas, foi variada a proporção da PEI com o intuito de se alcançar nanopartículas catiônicas com baixa polidispersão, e baixa quantidade de PEI, pois esse polímero em altas concentrações é citotóxico (LIANG et al., 2008; VICENTINI et al., 2013a,b; BORGHETI-CARDOSO et al., 2015). Dessa forma, as quantidades de Compritol® 888 ATO e poloxamer 188 foram fixadas em 2 % e 1,5 % p/p, respectivamente, enquanto que a quantidade de PEI foi variada em 0,00 %, 0,10 %, 0,150 %, 0,20 %, 0,25 %, 0,50 %, 0,750 % e 1,00 % p/p, conforme Tabela 2. Nesse estudo as formulações foram homogeneizadas por 7,5 min no ultra-turrax a 75 ± 2 ºC.

Tabela 2 - Quantidade em % dos constituintes utilizados na otimização do processo de produção das NLS.

Formulações	PEI	Compritol® 888 ATO	Poloxamer 188	Fase aquosa
F16	0,10	2,00	1,50	96,40
F17	0,15	2,00	1,50	96,35
F18	0,20	2,00	1,50	96,30
F19	0,25	2,00	1,50	96,25
F20	0,50	2,00	1,50	96,00
F21	0,75	2,00	1,50	95,75

Padronizada e otimizada a produção das nanopartículas assim como seus constituintes, seguiu-se com a caracterização físico-química dessas nanoestruturas.

3.2.1.2 Análise do diâmetro médio e distribuição do tamanho das NLS-PEIs

O diâmetro médio (*z-average*) e o índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS)

utilizando o aparelho NanoSize ZS, Malvern (ângulo de 90°), diluídas em água purificada na proporção 1:400.

3.2.1.3 Determinação da carga superficial das NLS-PEIs

A carga superficial das nanoparticulas foi medida como potencial zeta, o qual é determinado pela mobilidade eletroforética das partículas/gotículas dispersas submetidas a um campo elétrico. As análises foram realizadas pelo equipamento Zetasizer Nano System ZS, Malvern. As dispersões de NLS-PEIs foram diluídas na proporção de 1:40 em água ultra purificada e submetidas à análise.

3.2.1.4 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento de nanopartículas foi realizada com o intuito de se verificar o diâmetro e a concentração das nanopartículas. As amostras foram diluídas em água ultrapurificada e injetadas no compartimento de amostras com seringas estéreis. O software utilizado para a captura e análise dos dados foi a NTA 3.1. Vídeo das amostras foi capturado por câmara EMCCD 215S, com ajustes manuais para melhoramento da imagem. Todas as medições foram realizadas em quintuplicata e à temperatura ambiente.

3.2.1.5 Analise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Esse ensaio foi realizado para se verificar a morfologia das nanopartículas. As amostras foram diluídas em água e gotejadas sobre superfícies de micas recém clivadas. Após isso, foram secas com jato de argônio. As análises de AFM foram obtidas utilizando o microscópio de varredura (*Scanning Probe Microscope*), operando no modo fase (ou contato intermitente, ou *tapping*), à temperatura ambiente. Para a análise foram utilizadas pontas de silício da Nanosensors, tipo PPP-NCHR, com as seguintes especificações de cantilever: espessura: 4.0±1 µm, comprimento:125±10 µm, largura: 30±7.5 µm, frequência de ressonância: 204-497 kHz, constante de força: 10-130 N/m.

A varredura foi realizada em condições de força constante e a velocidade de varredura foi adequadamente reduzida para evitar que a ponta induzisse deformações nas vesículas ou danos na amostra.

3.2.1.6 Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial foi utilizada para identificar o ponto de fusão do lipídeo e tensoativo utilizados e verificar a cristalinidade das partículas e sua estabilidade. As curvas DSC foram obtidas em atmosfera de N_2 (50 mL min^{-1}) utilizando um porta-amostra de alumínio com tampa perfurada e como referência um porta-amostra similar vazio. A massa da amostra foi da ordem de 4,00 mg. A taxa de aquecimento foi de 10 °C min^{-1}, e a faixa de temperatura avaliada de 30 °C a 140 °C. O índice de recristalização (IR%) foi calculado pela equação 1 (SHAH et al., 2010):

$$IR\% = \left[\frac{\Delta H_{NLS-PEI}}{\Delta H_{Lipídeo\ puro} \times Fração\ de\ fase\ lipídica}\right] \times 100 \qquad (1)$$

Onde $\Delta H_{NLS\text{-}PEI}$ corresponde a entalpia de fusão da NLS-PEI e $\Delta H_{Lipídeo\ puro}$ a entalpia de fusão do compritol.

3.2.1.7 Avaliação da estabilidade das NLS-PEIs

A estabilidade física das nanodispersões foi avaliada através de medidas de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e DSC após armazenamento da amostra a 4 °C ± 0,5 °C e a 30 °C ±0,5 ºC, em intervalos pré-determinados (1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias), durante um período de 90 dias.

3.2.1.8 Complexação do siRNA com as NLS-PEIs

siRNA não específico (ns-siRNA) foi adicionado cuidadosamente às NLS-PEIs na concentração final de 10 µM sob sutil agitação por 30 minutos para complexação.

3.2.1.9 Ensaios em gel de eletroforese

Preparo do gel de agarose 2 %

O gel foi preparado usando 1,2 g de agarose, 60 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA pH 8,0 (TAE) e brometo de etídeo (5 mg/mL). A agarose foi adicionada ao tampão TAE e aquecida em micro-ondas por aproximadamente 2 minutos para promover sua solubilização. Após resfriamento, adicionou-se o brometo de etídeo (5 µL). O gel foi

vertido na placa de corrida e mantido a temperatura ambiente até o seu total resfriamento para sua polimerização. O tampão TAE também foi utilizado na corrida das amostras.

3.2.1.9.1 Determinação da capacidade da NLS-PEI complexar o siRNA

Para o estudo da eficiência de complexação do siRNA com as nanoparticulas desenvolvidas, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2%.

Preparo das amostras

As amostras analisadas foram:

- siRNA livre em água DEPC (10 µM);
- NLS-PEI;
- NLS-PEI + siRNA.

Em cada 30 µL das amostras preparadas foi adicionado 10 µL de *loading buffer* [utilizado para conferir densidade a amostra aplicada, composto por: azul de bromofenol (0,25 % p/v), xileno cianol FF (0,25 % p/v), orange G (0,25 % p/v), Tris-HCl pH 7,5 (10 mmol/L), EDTA (10 mmol/L) e sacarose (0,65 % p/v)]. Em seguida, 30 µL de cada amostra foi adicionada em cada poço do gel.

As corridas eletroforéticas foram processadas em cuba horizontal contendo o tampão tris-acetato-EDTA, sob uma voltagem de 100 V, 150 mA, durante 20 min. Os géis corados com brometo de etídeo foram observados sob luz ultravioleta para visualização das bandas de migração.

3.2.1.9.2 Avaliação da descomplexação do siRNA das NLS-PEIs

O método de competição com os poliânions de heparina foi realizado para averiguar se o siRNA possui a capacidade de se descomplexar das nanopartículas de forma intacta (QI et al., 102; ZHOU et al., 2012). Essa avaliação foi realizada por eletroforese. Para tanto, o protocolo de preparação do gel e da corrida eletroforética foram os mesmos descritos no item 3.1.2.9.1. As amostras analisadas neste estudo foram:

- siRNA livre em água DEPC (10 µM);
- NLS-PEI + siRNA (10 µM) sem heparina;

- NLS-PEI + siRNA (10 µM) com heparina;

Neste estudo, 10 µL de heparina (50000 UI/mL) foi adicionada nas amostras de NLS-PEIs + siRNA. Em seguida, este sistema foi mantido em repouso em banho termostatizado por 1 hora, a 37 ºC (para mimetizar as condições fisiológicas). Após este tempo, as amostras foram adicionadas no gel de agarose (30 µL/poço) e submetidas a corrida eletroforética.

3.2.1.9.3 Avaliação da estabilidade do siRNA complexado a NLS-PEI

O ensaio de estabilidade em Soro Fetal Bovino (SBF) (XIONG et al., 2009) foi realizado para averiguar se as nanopartículas apresentavam a capacidade de proteger o siRNA contra a degradação. As amostras analisadas nesse ensaio foram:

- siRNA livre em água DEPC (10 µM);
- NLS-PEI + siRNA (10 µM) sem heparina;
- NLS-PEI + siRNA (10 µM) com heparina;
- Lipofectamina + siRNA (10 µM) sem heparina;
- Lipofectamina + siRNA (10 µM) com heparina

Essas amostras foram incubadas com 25% de SBF por 24 horas a 37 ºC. Após esse tempo, tais amostras foram submetidas ao ensaio de descomplexação com heparina por 1 hora antes da avaliação por eletroforese, para garantir completa liberação do siRNA da formulação. Para tanto, o protocolo de preparação do gel e da corrida eletroforética foram os mesmos descritos no item 3.2.1.9.1.

3.3 ESTUDOS *IN VITRO*

3.3.1 Linhagem celular e cultivo

Células imortalizadas de Queratinócitos Humanos – linhagem HaCaT e células de Fibroblastos de camundongos – linhagem BALB/3T3 clone A31 foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 1% (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico e 10% (v/v) de SBF inativado (meio de cultura completo). As células foram incubadas a 37 °C com 5% de CO_2, condições normais de cultivo. Periodicamente, as células foram lavadas com tampão PBS (*Phosphate Buffer Solution*, pH 7,5) e

desagregadas da garrafa com tripsina 5% (p/v). Após a desagregação, as células foram centrifugadas a 129 x *g* por 5 min, ressuspendidas em meio de cultura completo. O número de células viáveis para o cultivo e plaqueamento foi determinado homogeneizando-se uma alíquota da suspensão celular com a quantidade equivalente de solução de Azul de Tripan a 0,4%, contando as células em câmara de Neubauer e excluindo as células que incorporaram o corante.

3.3.2 Estudo da Curva de Crescimento de células HaCaT

A importância de se estabelecer a curva de crescimento de células está na determinação do momento ideal para o repique das células. Dessa forma, esse estudo foi realizado com o intuito de se identificar todas as fases de crescimento e morte celular, assim como para se determinar o tempo que as células levam para atingir 70% de confluência, que é considerado ideal para fazer o repique celular (ALVES & GUIMARÃES, 2010).

A curva de crescimento celular foi acompanhada por 7 dias. No dia 0, 7 garrafas de 25 cm^2, foram semeadas com 5 x 10^5 células/garrafa e, em seguida, cultivadas como descrito no item 3.3.1. A cada dia, uma garrafa foi analisada quanto a confluência, em seguida tripsinizada e a quantidade de células vivas e mortas foi determinada, utilizando como indicador de viabilidade o Azul de Tripan. Neste experimento, foram utilizadas 7 garrafas em 7 dias, sendo analisada uma por dia.

3.3.3 Avaliação da viabilidade celular

As células foram inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5 x 10^4 células/poço para HaCaT e 1 x 10^4 células/poço para 3T3. As células foram tratadas com diferentes concentrações das NLS-PEIs (Diluições de 50X a 1600X). A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de redução da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido, 0,1 mg/mL) após 4 e 24 h de tratamento com as NLS-PEIs.

3.3.4 Estudos de captação celular

Para verificar a capacidade das NLS-PEIs em transfectar as células e consequentemente entregar o siRNA para o citoplasma da célula alvo, realizou-se a

avaliação da eficiência de transfecção celular por dois métodos diferentes: Citometria de fluxo e Microscopia Confocal de fluorescência por varredura a laser.

3.3.4.1 Avaliação da captação celular por Citometria de Fluxo

As células em estudo foram inoculadas em placas de 12 poços a uma densidade de 3 x 10^5 células/poço para os queratinócitos e 1,25 x 10^5 células/poço para os fibroblastos, contendo 1 mL de meio/poço.

A partir do estudo de viabilidade celular, foi padronizada a concentração das NLS-PEIs para realização desse ensaio. Após 24 h do plaqueamento celular, o meio de cultura foi renovado por meio de cultura incompleto e foi adicionado 100 µL de cada amostra complexada com o siRNA Alexa® fluor 647 (40 pmol/poço) para ensaio de transfecção celular. As células expostas às formulações foram re-incubadas por 4h e 24 h a 37 ºC com 5% CO_2. Após este tempo, as células foram tripsinizadas e a captação celular avaliada por citometria de fluxo utilizando um Citômetro Facscanto BD FACSCalibur™ equipado com 3 lasers (488, 633 e 405 nm) e um filtro de emissão de 660/10 nm para o Alexa flúor®. Foi utilizado iodeto de propídeo (50 µg/mL) como indicador de viabilidade celular. Foram coletados 10000 eventos por amostra analisada.

Lipofectamine® 2000 (2 µL/poço diluída em meio Opti-MEM) foi utilizada para estudar e comparar a captação celular dos complexos. A lipofectamina é um lipossoma catiônico disponível comercialmente como carreador de genes, em que sua alta eficiência de transfecção foi comprovada em diversos modelos celulares (DALBY *et al*., 2004; CARDARELLI et al., 2016), portanto esse reagente foi utilizado no presente trabalho como controle positivo. Células sem tratamento foram utilizadas como controle de viabilidade celular e células tratadas com o siRNA livre para demonstrar que esse composto é incapaz de se ligar ou atravessar as membranas celulares passivamente por ser uma macromolécula hidrofílica com carga residual negativa (ALIABADI et al., 2012; GUZMAN-VILLANUEVA et al., 2014).

3.3.4.2 Avaliação da captação celular por Microscopia Confocal

Células de queratinócitos e fibroblastos foram inoculadas em placas de 12 poços acrescidas de uma lamínula, previamente tratada com glutaraldeído, a uma densidade de 3 x 10^5 células/poço e 1,25 x 10^5 células/poço respectivamente, para os ensaios de captação celular.

Após 24 h do plaqueamento celular, o meio de cultura foi renovado e adicionou-se 100 µL das formulações previamente diluídas em tampão PBS contendo 40 pmol de siRNA-Alexa/poço. As células expostas às formulações foram incubadas por 24 h a 37 ºC com 5% CO_2. Depois, lavou-se os poços com PBS e adicionou-se 1 mL da solução de paraformaldeido 1% *overnight*. Passado esse tempo, lavou-se duas vezes o poço com tampão PBS, retirou-se a lamínula e colou-a na lâmina de vidro com Prolong Gold® contendo DAPI (10 µL/lamínula) (Comprimento de excitação 350 nm, comprimento de emissão 470 nm). Após o tempo necessário para secagem, visualizou-se a lâmina por microscopia confocal de varredura a laser acoplado a uma câmara fotográfica, utilizando as objetivas convenientes e filtro de comprimento de onda de excitação adequado para o Alexa 647 e o DAPI. Lipofectamine® 2000 foi utilizada como controle positivo de transfecção.

3.3.5 Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HaCaT pelo siLuc liberado das NLS-PEIs

A eficiência de silenciamento *in vitro* do siRNA veiculado pelas nanoparticulas em estudo foi investigado usando células HaCaT e ensaio duplo de luciferase [Luciferase Reporter Assay System (Promega, Holanda)]. Primeiro, $1x10^6$ células foram semeadas em garrafas de 25 cm^2 em meio sem antibiótico por 24 h. Logo após, estas células foram transfectadas com vetores Firefly luciferase (pCMV-Luc) (PlasmidFactory, Alemanha) e Renilla luciferase [pGL4.74 (hall/TK)] (Promega, Holanda) por 24 h complexados a lipofectamina. Então as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e plaqueadas em placa de 96 poços na densidade de 5×10^4 células/poço.

Após 24h, o meio foi substituído por um novo sem antibiótico e as células foram tratadas com Lipofectamina 2000; NLS-PEI 0,15% e 0,25% complexados a 100 pmol de Firefly luciferase siRNA (siLuc)/$1x10^5$ células ou siRNA não específico (controles). As células foram reincubadas, 24 horas depois retirou-se o meio, lavou-se o poço com PBS e foi adicionado meio completo sem antibiótico.

48h após o tratamento, as células foram lisadas com Passive Lysis Buffer (Promega) (200 µL/poço) numa plataforma de agitação de placas por 45 min e 10 µL foi transferido para uma placa branca de 96 poços. Um ensaio duplo de luciferase foi realizado pela adição de 50 µL de reagente de Luciferase as amostras na placa. A luminescência foi imediatamente medida em um leitor de placas com mistura inicial por 2 s seguido da medida da luminescência por 5 s em intervalos de 0.5 s. Subsequente, 50

µL do reagente Stop&Glo foi adicionado em cada amostra e a luminescência foi medida. Para calcular a eficiência de silenciamento, a luminescência da Firefly luciferase foi normalizada pela luminescência da Renilla luciferase pela formula: AUC-5s Luminescência da Firefly/AUC-5s Luminescência da Renilla.

3.3.6 Avaliação da penetração cutânea *in vitro* das nanopartículas por microscopia de fluorescência

A penetração do sistema foi investigada utilizando siRNA-FAM. A pele da orelha de suínos foi utilizada como modelo de membrana biológica e montada em células de difusão de Franz, como descrito por Lopes e colaboradores (2006), com um compartimento de 3 mL e uma área de difusão de 0,78 cm^2. As amostras de pele dermatomizadas (espessura 500 µm) foram pinçadas entre as duas câmeras verticais de células de difusão, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor. O compartimento receptor foi mantido a 32 ºC com homogeneização constante 500 rpm. Foi aplicado no compartimento doador 200 µL das NLS-PEIs complexadas com o siRNA FAM, siRNA FAM livre ou PBS, vedando o compartimento e mantendo-o ao abrigo da luz.

Após 24 h da aplicação o excesso da formulação foi retirado cuidadosamente com papel absorvente, as peles foram retiradas das células de difusão, congeladas em matriz O.C.T. (Tissue Tek®) e seccionadas transversalmente em criostato. Foram obtidos cortes histológicos de 50 µm de espessura, montados em lâminas de vidro gelatinizadas e sem nenhuma coloração adicional.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência acoplado a uma câmara fotográfica com software analisador de imagem (modelo AxioVision, Carl Zeiss), utilizando objetiva de 10 vezes e filtro FS46 com excitação e emissão adequados para o marcador (500 ± 20 nm e 535 ± 30 nm, respectivamente).

3.4 ESTUDOS *IN VIVO*

3.4.1 Animais

Os estudos *in vivo* foram conduzidos utilizando camundongos sem pelos, adultos da linhagem HRS/J laboratório Jackson (BarlHarbor, ME, EUA). Os animais foram criados no Biotério da FCFRP-USP, mantidos a 20-25 ºC, com livre acesso de água e

alimento, 4 trocas de ar/h e ciclos claro/escuro de 12 h. os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto-USP (protocolo nº14.1.799.53.5).

3.4.2 Indução da inflamação cutânea e esquema terapêutico

A indução de TNF-α na pele de camundongos foi realizada utilizando o modelo de inflamação cutânea aguda e crônica, induzida por 12-O-tetradecanoil-forbol 13-acetato (TPA) previamente solubilizada em acetona em quantidades ideais para obter a concentração de 162 µM em 100 µL de solução, conforme descrito por Murakawa e colaboradores (2006) e Kalaiarasu et al., (2016).

Inflamação aguda

Para avaliar o potencial do siRNA incorporado nas NLS-PEI sobre a expressão de TNF-α em modelo de inflamação cutânea aguda, os animais foram divididos em 3 grupos com 5 animais em cada. Em todos os grupos a amostra foi aplicada topicamente utilizando uma área de aproximadamente 2 cm^2 no dorso do animal:

Grupo 1: Grupo Controle Negativo. Não foi induzida a inflamação e nenhum tratamento foi realizado neste grupo. Uma dose única de acetona (100 µL) foi administrada neste grupo;

Grupo 2: Grupo Controle Positivo. Neste grupo, uma dose única de TPA (100 µL) foi utilizada para induzir a inflamação seguida de nenhum tratamento;

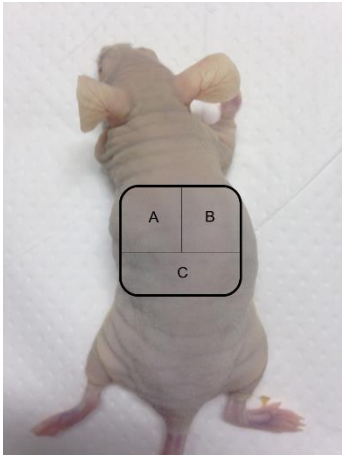
Grupo 3: Grupo de tratamentos. Neste grupo foi aplicado a primeira dose do tratamento (100 µL), após 1 h foi aplicado uma dose única de TPA (100 µL) e após 30 min foi aplicado a segunda dose de tratamento. Tais tratamentos utilizaram as seguintes formulações:

- NLS-PEI Vazia
- NLS-PEI + siRNA não específico (ns-siRNA) na concentração final de 10 µM
- NLS-PEI + siRNA específico (siTNF-α) na concentração final de 10 µM

Após 6h os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono e a área da pele tratada foi removida e dividida em três partes menores (Figura 8), a primeira parte foi armazenada a -80 ºC em solução estabilizadora de RNA (RNAlater® Stabilization solution – Ambion, Carlsbad, CA, USA), a segunda parte foi armazenado

também a -80 ºC para análise por ELISA e a terceira parte embebida em formol tamponado para posterior analise histológica.

Figura 8 - Representação da divisão da pele do camundongo para estudo, sendo A usado para ELISA, B usado para PCR e C embebido em formol tamponado.



Inflamação crônica:

Para avaliar o potencial do siRNA incorporado nas NLS-PEI sobre a expressão de TNF-α em modelo de inflamação cutânea crônica, os animais foram divididos em 3 grupos com 5 animais em cada. Em todos os grupos a amostra foi aplicada topicamente utilizando uma área de aproximadamente 2 cm^2 no dorso do animal:

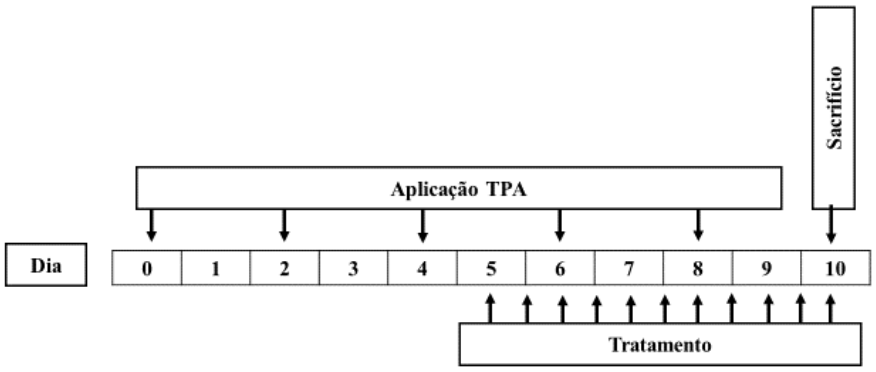
Grupo 1: Grupo Controle Negativo. Neste grupo não foi induzida a inflamação e não foi realizado o tratamento. Neste grupo apenas uma dose diária de acetona (100 µL) foi administrada;

Grupo 2: Grupo Controle Positivo. Neste grupo doses de TPA (100 µL) foram aplicadas em dias alternados, por um período de 10 dias para induzir a inflamação seguida de nenhum tratamento. Este protocolo foi seguindo conforme metodologia validada por Alford et al., 1992 (Figura 9).

Grupo 3: Grupo de tratamento. Neste grupo os animais receberam a dose de TPA (100 µL) em dias alternados, semelhante ao grupo II. Do quinto dia de estudo em diante, fez-se o tratamento com 100 µL das formulações de 12 em 12 h (Figura 9).

As formulações utilizadas no tratamento foram as mesmas da inflamação aguda.

Figura 9 - Esquema terapêutico de indução da inflamação crônica por TPA e tratamento com as formulações.



No final do experimento, os camundongos foram macroscopicamente observados e fotografados quanto a aparência da pele e aparecimento de lesões. Logo então, os animais foram sacrificados e a pele tratada foi removida e dividida em três partes menores (Figura 8), de acordo com o descrito para a inflamação aguda.

3.4.3 Avaliação da quantidade de interleucina TNF-α por ELISA

Para a dosagem das interleucinas, a pele do dorso dos animais foi coletada logo após o tratamento, conforme demonstrado no item 3.4.2 e armazenada a – 80 °C para posterior análise. As amostras de pele foram trituradas em Ultra-Turrax® T25 digital em solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5) contendo EDTA e inibidores de protease, seguido de centrifugação a 18514 *x g* por 10 min a 4 °C em centrífuga Eppendorf (modelo 5810R). Logo após, o sobrenadante foi coletado e a interleucina TNF-α foi quantificada por imunoensaio ELISA em kit específico para citocinas de camundongos da marca Affymetrix Ebioscience conforme instruções do fabricante. A quantificação de proteína das amostras foi calculada através da técnica de Bradford. Os resultados foram expressos em picogramas de TNF-α por miligrama de proteína da pele.

3.4.4 Avaliação da eficácia do siRNA TNF-α veiculado pela NLS por meio da quantificação dos níveis do RNAm TNF-α por qRT-PCR

Para determinação nos níveis do RNAm TNF-α as amostras de pele tratadas e coletadas conforme item 3.4.2 foram transferidas para eppendorfs contento 500 µL do tampão de lise RLT, homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador de tecido

(Ultra-Turrax® T25 digital), 20.000 rpm por 1 min e submetidas à centrifugação a 400 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e, em seguida, foram adicionados 500 µL de etanol 70%. As soluções obtidas (1 mL) foram utilizadas para extração do RNA utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Isolamento do RNA

O isolamento do RNA das células foi realizado utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA).

Foram adicionadas 300 µL de tampão RLT por poço para lisar as células. Com o auxílio de uma pipeta, as células foram homogeneizadas e, em seguida, foram adicionadas 300 µL de etanol 70 %.

As amostras foram transferidas para as colunas de extração e submetidas à centrifugação por 1 min, a 10.000 x *g*. As soluções eluídas através das colunas foram descartadas. Em seguida foi realizado uma lavagem utilizando 700 µL do tampão RW1 (colunas submetidas à centrifugação por 1 min, 10.000 x *g*) e outras duas utilizando 500 µL do tampão RPE + etanol (colunas submetidas à centrifugação por 1 min, 10.000 x *g*); as soluções eluídas foram descartadas.

Após finalizadas as lavagens, as colunas foram submetidas à centrifugação por 2 min, a 10.000 x *g* para remoção total do tampão e transferidas para eppendorfs livre de RNase. Para eluição do RNA, foram adicionadas 40 µL de água livre de RNase diretamente nas membranas das colunas que foram submetidas à centrifugação por 1 min, a 10.000 x *g*. A concentração de RNA extraído foi quantificada por espectrometria em 260 e 280 nm utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Sintese do cDNA

O cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Para as reações, foram adicionados 10 µL do master mix (2 µL de tampão, 0,8 de µL dNTP, 2 µL de primers randômicos, 4,2 µL de água ultrapura e 1 µL da enzima transcriptase reversa) e 10 µL da solução de RNA (100 µg/mL - 1 µg RNA/reação) por tubo de 0,1 mL.

Os tubos foram colocados no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e foi utilizada a seguinte condição para a reação da transcriptase reversa: 25 °C por 10 min para ligação do *primer* ao RNA, 37 °C por 2 h para transcrição reversa utilizando a enzima transcriptase reversa e

posterior incubação a 85 °C por 5 min para inativação da enzima e finalização do processo e, 4 °C por tempo indeterminado (até a remoção das amostras do equipamento).

Transcrição reversa e reação da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

Os cDNAs obtidos foram amplificados por qRT-PCR utilizando os *primers* para o gene *Tnf* e para os genes de referência *Gapdh* e beta actina (*Actb*), utilizados como controles endógenos. Os primers foram obtidos da *Integrated DNA Technologies* (IDT, Coralville, Iowa, USA) e possuem as seguintes sequencias:

Tnf:

Sonda: 5'-/56-FAM/CCACGTCGT/ZEN/AGCAAACCACCAAGT/3IABkFQ/-3'

Primer 1: 5'-TCTTTGAGATCCATGCCGTTG-3'

Primer 2: 5'-AGACCCTCACACTCAGATCA-3'

Gapdh:

Sonda: 5'-/56-FAM/TGCAAATGG/ZEN/CAGCCCTGGTG/3IABkFQ/-3'

Primer 1: 5'-GTGGAGTCATACTGGAACATGTAG-3'

Primer 2: 5'-AATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'

Actb:

Sonda: 5'-/HEX/AGACCTTCA/ZEN/ACACCCCAGCCATG/3IABkFQ/-3'

Primer 1: 5'-GTACGACCAGAGGCATACAG-3'

Primer 2: 5'-CTGAACCCTAAGGCCAACC-3'

Para as reações de amplificação foi utilizado o kit *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas utilizando a mistura dos seguintes reagentes: 10 µL do TaqMan master mix (composto por: Taq DNA polimerase, tampão, dNTP, 6,4 mM $MgCl_2$), 1 µL do *primer Gapdh* ou 1 µL do *primer Tnf*, 1 µL do *primer Actb*, 50 ng de cDNA, água livre de RNase na quantidade suficiente para completar 20 µL do volume final dos reagentes. A placa foi selada e submetida à centrifugação por 2 min, 1.000 x *g* para assegurar que todos os reagentes se encontrassem no fundo dos poços.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e seguiram o seguinte programa: 1 ciclo de 95 °C por 20 s para ativação da enzima polimerase e 40 ciclos de 95 °C por 1 s para desnaturação do DNA; 60 °C por 20 s para o anelamento dos *primers* e polimerização. O StepOne™ Software, v.2.2.2, foi utilizado

para quantificar as amostras por meio da análise da quantidade de fluorescência gerada pela liberação dos fluoróforos 6-FAM e HEX após a clivagem pela exonuclease 5'.

Os resultados obtidos foram analisados com base no valor do Ct, sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo no qual a amplificação das amostras atinge um limiar. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o método ΔCt, com base na expressão dos genes *Gapdh* e *Actb*.

3.4.5 Análises histológicas

Fragmentos da pele dorsal dos camundongos previamente tratados e coletadas conforme item 3.3.2 foram fixados em solução de formalina 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5). A seguir, as amostras foram submetidas a sessões de desidratação em etanol 70%, 95% e 100%, seguidas de xilol (I, II e III) e então incluídas em parafina. Espécimes de 5 µm foram obtidos com o auxílio de micrótomo rotativo manual e, depois, montados em lâminas. A seguir, parte das lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina (H&E) para avaliação histopatológica geral das amostras e outra parte das lâminas foram submetidos à coloração pelo método de Picrosirius a 0,1% dissolvido em solução aquosa de ácido pícrico saturado (JUNQUEIRA, at al., 1978), esta coloração tem sido largamente utilizada para corar colágeno em cortes histológicos, com intuito de análise qualitativa.

As lâminas coradas por H&E foram visualizadas em microscópio óptico equipado com câmera digital com sistema de vídeo e aquisição automática. Já as lâminas coradas por Picrosirius foram visualizadas em microscópio óptico de luz equipado com câmera digital, equipado com um polarizador de luz acoplado ao analisador de imagem, a quantidade de colágeno foi determinada com o auxílio do AxioVision software release 4.1.

Tanto para o H&E quanto para o Picrosirius foram realizadas leituras em objetiva de 20X abordando todas as camadas da pele: estrato córneo, epiderme e derme. Para análise do Picrosirius, o colágeno presente nos tecidos analisados foi medido pela seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas ou alaranjadas e amareladas ou esverdeadas, correspondentes às bandas colagênicas polarizadas de fibras grossas (maduras) e finas (imaturas), respectivamente (JUNQUEIRA et al., 1978).

3.4.6 Avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLS-PEI por microscopia confocal de varredura a laser.

A penetração do siRNA na pele dos camundongos foi investigada por microscopia confocal de varredura a laser e foi realizada em pele íntegra e em pele com inflamação aguda induzida por TPA (Conforme ítem 3.4.2.). Para isso, foi utilizado um siRNA controle marcado com Alexa-647, adequado para excitação com o laser 638 nm e possui emissão máxima em comprimentos de onda acima de 665 nm.

Após tratamento, as peles foram removidas, lavadas cuidadosamente, congeladas em Tissue Tek® e seccionadas transversalmente em criostato. Foram obtidos cortes histológicos de 10 µm de espessura, montados em lâminas silanisadas para auxiliar a aderência do corte à lâmina.

Os cortes foram lavados com PBS para remoção do excesso de Tissue Tek e incubados com solução DAPI (0,3 µg/mL) por 15 min. Após esse período, os cortes foram novamente lavados com PBS, foi adicionado 1 ou 2 gotas do meio de montagem *fluoromount* sobre os cortes e a lamínula foi colocada cuidadosamente sobre os cortes para não ocorrer a formação de bolhas. As lâminas foram armazenadas sob-refrigeração (2-8 ºC) durante 24 h para secar o meio de montagem.

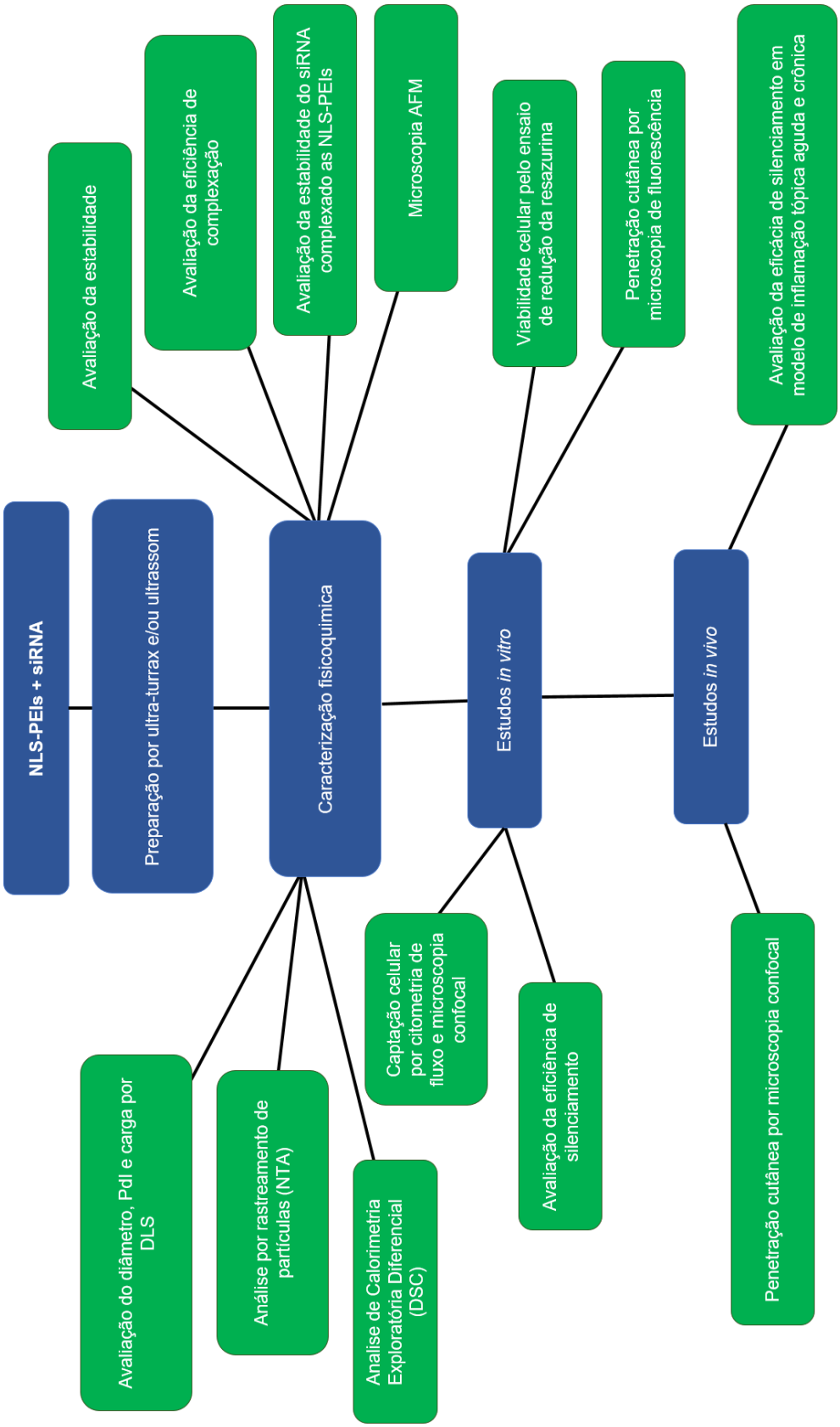
As lâminas foram visualizadas em microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP8 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). As imagens foram adquiridas no aumento de 63X, utilizando os lasers e sensibilidade (ganho/offset) das fotomultiplicadoras foram ajustados e mantidos constantes. O software LAS X foi utilizado para aquisição e processamento das imagens.

3.5 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados das amostras foram avaliados por análise de variância (ANOVA de uma via) seguido do teste de comparações múltiplas Turkey para comparar todos os grupos estudados. A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad Prism® (versão 5.01, Califórnia, EUA) com média ± desvio padrão, com intervalo de confiança de 95%.

Diante de todas essas metodologias, segue fluxograma indicando todos os estudos realizados no presente trabalho (Figura 10):

Figura 10 - Fluxograma dos ensaios realizados neste trabalho.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NLS-PEIS.

4.1.1 Preparo das NLS-PEIs.

Na fase inicial do processo de desenvolvimento da formulação é de grande importância avaliar o tipo e a quantidade dos componentes que farão parte desse sistema, pois o tamanho de carreadores lipídicos pode ser afetado pela sua composição, pelo método e condições de preparo dos mesmos (MARCATO, 2009). Para otimização da formulação, foram utilizados os lipídeos Compritol® 888 ATO e Dynasan® e os tensoativos poloxamer 188 e poloxamer 407, utilizando como parâmetros de análise o tamanho médio, a distribuição e o potencial zeta das nanopartículas. Vale ressaltar que a PEI foi adicionada à constituição das nanopartículas por ser amplamente utilizado para formar complexos com ácidos nucleicos por ligações do tipo não covalentes (SAWANT et al., 2012).

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizada na caracterização das nanopartículas, determina o diâmetro hidrodinâmico das partículas por meio da relação entre as flutuações de intensidades de luz espalhadas pelas partículas com o seu diâmetro através da relação de Stoken-Einsten, quando submetidas à incidência de um lazer. As flutuações de luz são decorrentes do movimento browniano e do diâmetro das partículas presentes nas dispersões coloidais, em que partículas menores se movimentam mais rapidamente que partículas maiores (MALVERN, 2016).

O potencial zeta foi determinado por espalhamento de luz eletroforético. Para tanto, as dispersões de nanopartículas foram colocadas em uma célula com dois eletrodos e inserida no equipamento onde um campo elétrico foi aplicado resultando na mobilidade das partículas (mobilidade eletroforética) em direção ao eletrodo de carga oposta a elas. A velocidade do movimento é proporcional à força do campo aplicada e de seu potencial zeta (MALVERN, 2016).

Na Tabela 3 encontram-se tais resultados obtidos pela técnica do DLS.

Tabela 3 - Diâmetro médio (nm), Índice de Polidispersão (PdI) e Potencial Zeta (mV) das formulações estudadas seguidas de seu respectivo Desvio Padrão entre parênteses, n=3.

Formulações	Diâmetro (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
F1	334,85 (107,83)	0,53 (0,13)	-7,32 (9,44)
F2	322,05 (8,13)	0,63 (0,14)	11,03 (12,83)
F3	1403,00 (288,50)	0,51 (0,11)	3,29 (0,88)
F4	830,85 (80,96)	0,61 (0,01)	9,89 (0,13)
F5	113,70 (1,27)	0,25 (0,01)	-15,35 (2,76)
F6	143,20 (20,79)	0,34 (0,03)	-8,33 (7,88)
F7	198,50 (4,53)	0,44 (0,01)	17,95 (6,72)
F8	219,35 (8,84)	0,42 (0,00)	36,60 (0,28)
F9	182,80 (13,45)	0,37 (0,03)	38,75 (2,14)
F10	236,35 (14,24)	0,43 (0,09)	36,83 (1,56)
F11	250,95 (59,25)	0,45 (0,07)	37,18 (1,74)
F12	267,55 (43,18)	0,44 (0,02)	38,63 (3,21)
F13	977,05 (67,81)	0,39 (0,08)	36,70 (0,85)
F14	201,90 (0,42)	0,36 (0,03)	30,85 (0,78)
F15	111,30 (15,41)	0,37 (0,01)	30,13 (0,66)

Foi observada que as formulações (F1, F2, F3 e F4), que utilizaram Dynasan® como lipídeo, apresentaram diâmetro maior (acima de 300 nm) do que as formulações onde utilizou-se Compritol® 888 ATO. Olbrich e colaboradores (2002) obtiveram diâmetro médio semelhante quando produziram NLSs de Dynasan® utilizando poloxamer 188 ou poloxamer 407 em homogeneizador de alta pressão.

Para as formulações as quais foi adicionada PEI (F3 e F4), observou-se que o diâmetro médio ficou acima de 800 nm, o que não é interessante para o presente trabalho, pois nanopartículas com esse diâmetro médio provavelmente apresentariam dificuldades em atravessar o estrato córneo (ALBANESE et al., 2012). Além disso, Zhou e colaboradores (2012) demonstraram que complexos de siRNA com diâmetros maiores

não transfectam membranas celulares com eficácia. Dessa forma, a utilização do Dynasan® para obtenção de NLS-PEIs foi desencorajada.

Quanto às formulações (F5, F6, F7 e F8) onde foi utilizado Compritol® 888 ATO como fase oleosa (2% p/p), observou-se um diâmetro médio abaixo de 250 nm para os dois tensoativos. Como forma de triagem, foi escolhido o poloxamer 188 devido ao fato de ser mais relatado na literatura para composição de NLSs com o Compritol® 888 ATO (HIPPALGAONKAR *et al*., 2013; BOSE *et al*., 2013).

Nas formulações F9-F12, foi fixada a quantidade do polaxamer 188 em 1,5% p/p, PEI em 1,0% p/p e variou-se a proporção da fase oleosa (1,0 a 5,0% p/p de Compritol® 888 ATO). Quanto maior a quantidade de lipídeos maior o diâmetro e índice de polidispersão devido à uma maior viscosidade da fase dispersa (Tabela 3). Além disso, a quantidade de tensoativos para recobrir a gotícula de lipídeo permaneceu fixa, dessa forma a vesícula emulsionada aumentou de tamanho para que a área interfacial do meio permanecesse a mesma. Assim, se aumentasse ainda mais a quantidade de lipídeo para uma mesma quantidade de tensoativos, o sistema provavelmente apresentaria indícios de instabilidade (HSU, NACU, 2003). O aumento no diâmetro médio das partículas em função do aumento da quantidade do lipídeo foi também observado por Pestana e colaboradores (2008). Em relação ao Potencial Zeta dessas formulações, foi observado que não houve alterações dos valores, visto que a quantidade do polímero catiônico permaneceu a mesma (1% p/p de PEI). Diante de tais resultados, foi escolhida uma concentração intermediária do lipídeo, 2,0%, para dar continuidade ao estudo.

No processo de emulsificação as moléculas do tensoativo interagem com as gotículas do lipídeo e entre si de modo a formar uma interface em torno dos glóbulos que evita ou minimiza os processos de desestabilização dos glóbulos como a floculação e coalescência (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). Após a escolha da porcentagem de lipídio, analisou-se a influência da porcentagem de estabilizante poloxamer 188 na formação das NLS-PEI, mantendo-se constante a porcentagem de lipídio em 2,0% e de PEI em 1%.

Analisando os resultados das formulações de F13 a F15 (Tabela 3), observa que o excesso de tensoativos no meio foi adsorvido na interface lipídeo-fase aquosa levando a diminuição na tensão interfacial do sistema com consequente redução do tamanho da gotícula e aumento da área interfacial, resultando em nanopartículas com diâmetro menor (TADROS *et al*., 2004). Kushwaha e colaboradores (2013) apresentaram resultados semelhantes quando produziram NLSs utilizando-se também de Compritol® 888 ATO como lipídeo e poloxamer 188 como estabilizante estérico para veiculação de

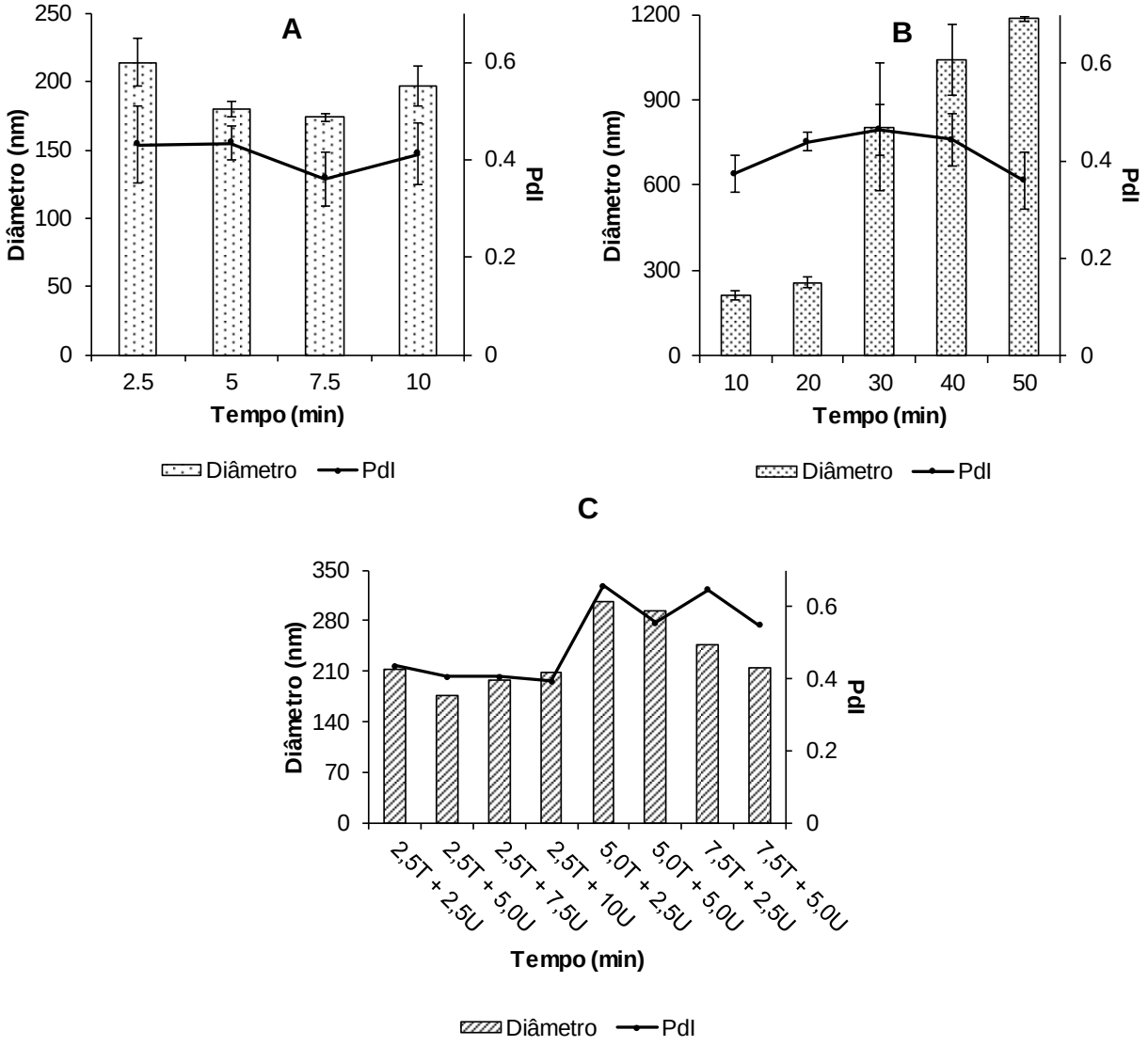
Hidrocloridrato de Raloxifeno. Quanto ao Potencial Zeta dessas formulações, foi observado que não houve alterações dos valores, visto que a quantidade do polímero catiônico permaneceu a mesma (1% p/p de PEI).

Diante dos resultados apresentados na Tabela 3, a formulação escolhida para dar seguimento ao estudo foi a formulação F8, contendo 2,0% de Compritol® 888 ATO, 1,0% de PEI e 1,5% de poloxamer 188 como estabilizante estérico. Logo após, foi investigada a influência de diferentes parâmetros de processo, incluindo aparelhagem e tempo de homogeneização, no diâmetro e índice de polidispersão das NLS-PEIs. Para este estudo foi utilizado o método de emulsificação à quente e homogeneização de alto cisalhamento (ultra-turrax) e/ou ultrassom de agulha. Este estudo foi realizado visto que o tempo de sonicação é um fator que pode influenciar o diâmetro e o índice de polidispersão de nanopartículas (SIDDIQUI *et al*., 2014).

Na Figura 11, encontram-se os resultados correspondentes a padronização da obtenção das NLS-PEIs utilizando ultra-turrax, ultrassom de agulha e ultra-turrax + ultrassom de agulha.

Como critério de seleção, optou-se pelas condições de homogeneização onde foram obtidas nanopartículas com os menores diâmetros médio e PdI. Na Figura 11 é possível observar que estas condições foram obtidas quando as NLS-PEI foram produzidas utilizando 7,5 min de homogeneização em ultra-turrax ou 10 min em Ultrassom de agulha ou 2,5 min de homogeneização em turrax seguido de 5 min de homogeneização no ultrassom de ponta. O aumento do tempo de sonicação tende a diminuir o diâmetro das partículas, pois alta intensidade na força cisalhamento supera as forças intrapartícula (KUSHWAHA *et al*., 2013). Todavia tempos mais altos de sonicação fornecem maior energia cinética às partículas, o que pode levar a aglomerações e consequente, aumento do tamanho (KHATTAR *et. al*., 2012). Esta tendência foi observada nas formulações preparadas no ultrassom de agulha (Figura 11-B e 11-C).

Figura 11 - Diâmetro e índice de polidispersão (PdI) das dispersões de NLS-PEIs, onde (A) corresponde as nanodispersões preparadas no ultra-turrax. (B) corresponde às nanodispersões preparadas no ultrassom. (C) corresponde às nanodispersões preparadas no ultra-turrax.



Depois de padronizada as condições para obtenção das nanopartículas, foi observado que o PdI das nanodispersões continuava alto independente da aparelhagem utilizada para homogeneização e do tempo de homogeneização. Dessa forma buscou-se uma redução da quantidade de PEI utilizado nas NLS-PEIs. Além disso, a redução da quantidade de PEI utilizada em nanocarreadores é importante pois é descrito na literatura que a PEI em altas quantidades é citotóxico devido a interações eletrostáticas com a membrana celular (LIANG *et al*., 2008; VICENTINI *et al.,* 2013a, b; BORGHETI-

CARDOSO *et al*., 2015). Na Tabela 4 encontram-se os resultados dos parâmetros analisados para tais formulações.

Tabela 4 - Diâmetro médio (nm), Indice de Polidispersão (PdI) e Potencial Zeta (mV) das formulações estudadas seguidas de seu respectivo Desvio Padrão (DP) entre parênteses.

Formulações	Diâmetro (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
F16	174,20 (1,68)	0,23 (0,02)	4,46 (0,75)
F17	164,03 (4,74)	0,27 (0,05)	11,50 (1,15)
F18	162,70 (11,01)	0,38 (0,04)	20,90 (2,87)
F19	175,15 (17,71)	0,29 (0,12)	27,18 (1,55)
F20	180,93 (5,85)	0,48 (0,05)	34,10 (3,55)
F21	212,68 (15,85)	0,46 (0,02)	32,38 (3,53)

O aumento gradativo do diâmetro médio e do potencial Zeta em relação ao aumento da quantidade de PEI (Tabela 4), permite inferir que o polímero catiônico se encontra na constituição da nanopartícula, com orientação para superfície, visto que a carga superficial das nanoparticulas sem a PEI é negativa (Tabela 3). Bivas-Benita e colaboradores (2004) obtiveram um resultado semelhante quando sintetizaram nanopartículas de PLGA [poli (ácido láctico-co-glicólico)] com PEI. Ulasov e colaboradores (2011) também conseguiram um resultado semelhante quando sintetizaram nanopartículas de PEG com PEI (polietilenoglicol).

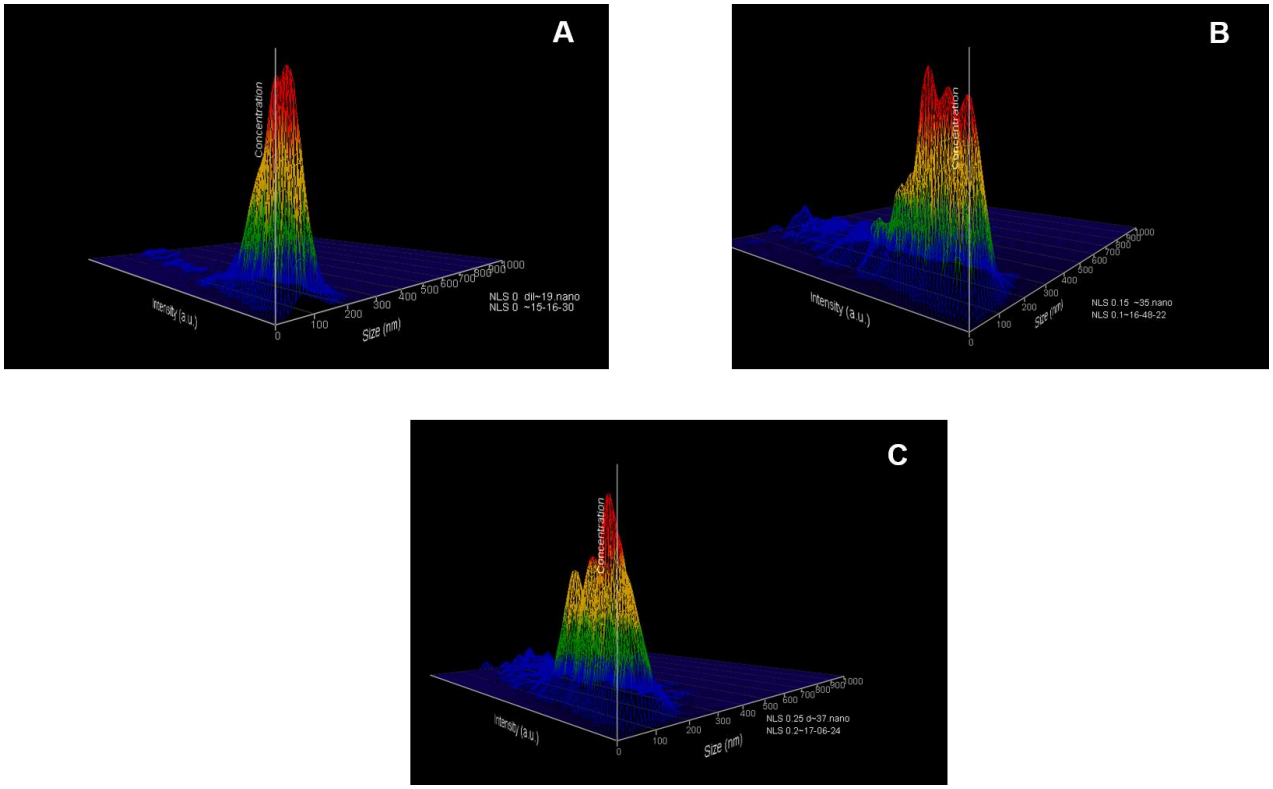
Na Tabela 4 observa-se que houve uma redução do PdI à medida que se reduziu a proporção de PEI nas nanoparticulas. Sendo assim, optou-se por concentrações intermediárias desse polímero, sendo escolhidas as formulações F17 e F19 contendo 2,0 % de Compritol® 888 ATO, 1,5 % de poloxamer 188 e 0,15 % (F17) / 0,25 % (F19) de PEI para dar continuidade ao trabalho.

4.1.2 Análise por rastreamento das NLSs (NTA).

A NTA (*Nano Trafficking Analysis*) utiliza as propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano para obter a distribuição de tamanho das partículas nas

amostras em suspensão líquida, é um sistema inovador para o dimensionamento de partículas de cerca de 10 a 1000 nm, dependendo do material da amostra (FILIPE, HAWE E JISKOOT, 2010; ASTM, 2012). A NTA possui a vantagem de ser apropriado para análise de amostras polidispersas e permite obter a concentração de partículas em amostras. Desta forma, é uma técnica interessante complementar ao DLS, apesar de que as medições dessas técnicas não dependerem somente do tamanho do núcleo da partícula, mas também do grau de aglomeração entre elas (TAKAHASHI *et al*., 2008). A Figura 12 mostra as distribuições de tamanho 3D para as partículas preparadas.

Figura 12 - Distribuição de tamanho de partículas em 3D por análise de rastreamento de nanopartículas. (A) NLS-PEI 0% (B) NLS-PEI 0,15%, (C) NLS-PEI 0,25%.



Os principais resultados obtidos por NTA estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados correspondentes ao diâmetro seguido do desvio padrão entre parênteses e concentração das NLSs analisadas por NTA.

Partícula	Diâmetro (nm)	Concentração (partículas/mL)
NLS-PEI 0 %	124,9 (44,1)	$2,30 \times 10^{13}$
NLS-PEI 0,15 %	174,4 (74,8)	$2,54 \times 10^{13}$
NLS-PEI 0,25 %	181,7 (76,6)	$2,62 \times 10^{13}$

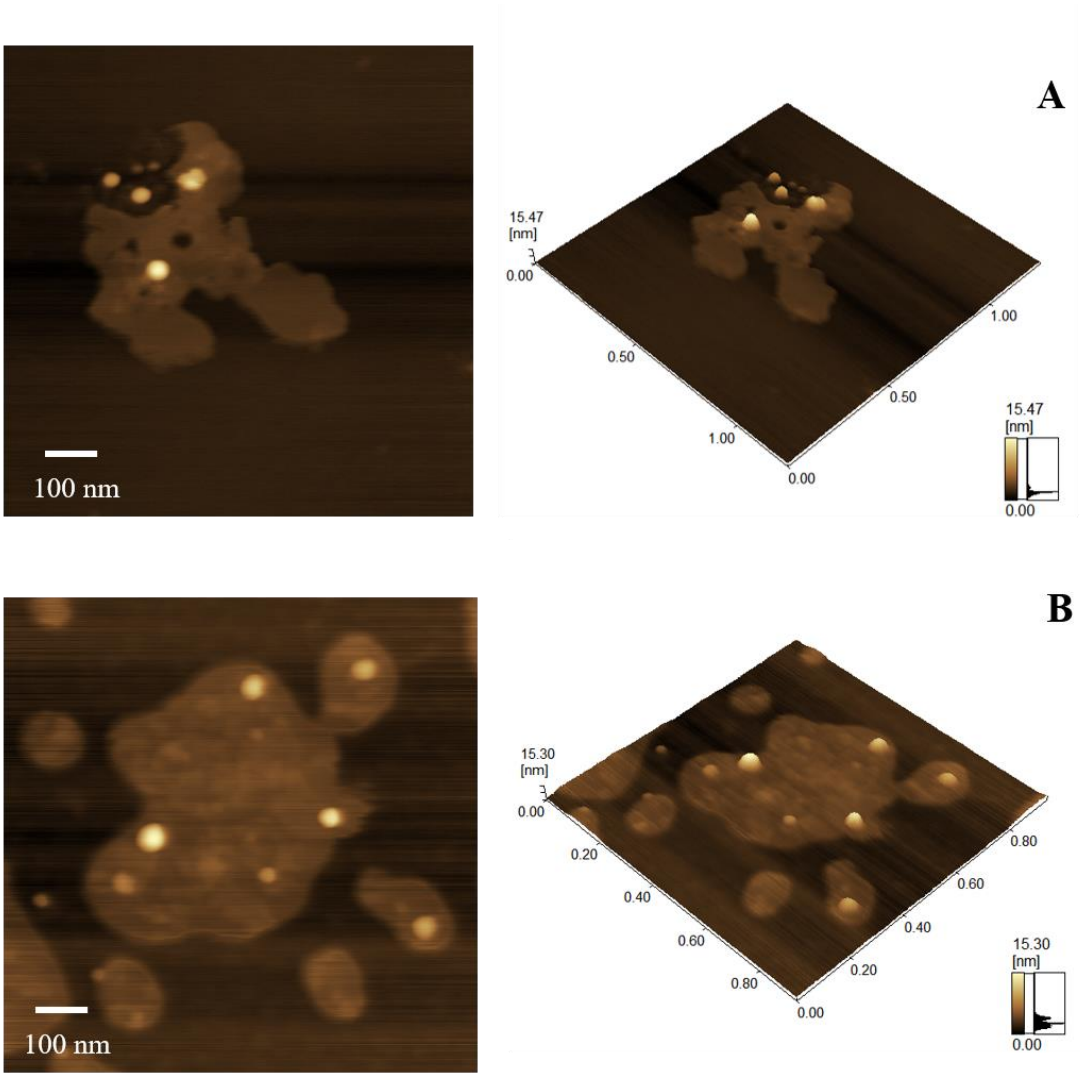
A concentração das partículas no meio é um dado importante que será utilizado nos estudos *in vitro* (KONG *et al*., 2011). Analisando a Tabela 5, foi observado que o aumento da quantidade de PEI na formulação aumentou o diâmetro e a concentração das partículas. Também foi observado que os valores do diâmetro das nanopartículas foram semelhantes aos valores encontrados no DLS (Tabela 3 eTabela 4, formulações F6, F17 e F19), apesar do tamanho médio ser obtido em função da média dos diâmetros de todas as partículas na dispersão na técnica de DLS e, portanto, ser inclinado para partículas maiores presentes na amostra. Já na técnica de NTA, as medidas são realizadas pelo rastreamento individual das nanopartículas, desta forma o diâmetro de cada partícula não é resultado de uma média (FILIPE, HAWE E JISKOOT, 2010).

4.1.3 Analise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Figura 13 mostra as imagens de AFM de cada amostra. Nesta Figura pode-se observar que as nanoparticulas são esféricas e com superfície lisa. De acordo com Mehnert and Mäder (2012), a heterogeneidade nos constituintes de uma nanopartícula favorece a formação de nanopartículas idealmente esféricas. Além disso, como observado pelas técnicas de DLS e NTA, o aumento da quantidade de PEI na formulação aumenta o diâmetro dessas partículas, sendo obtido 58,08 nm para NLS-PEI 0,15 e 67,51 nm para a NLS-PEI 0,25%.

A morfologia esférica para os carreadores lipídicos caracterizados por AFM foi descrita em outros trabalhos (OLBRICH et al., 2001; SITTERBERG et al., 2010; RIDOLFI et al., 2012).

Figura 13 - Morfologia 2D e 3D das NLS-PEI 0,15 (A) e 0,25 % (B) por Microscopia de Força Atômica.



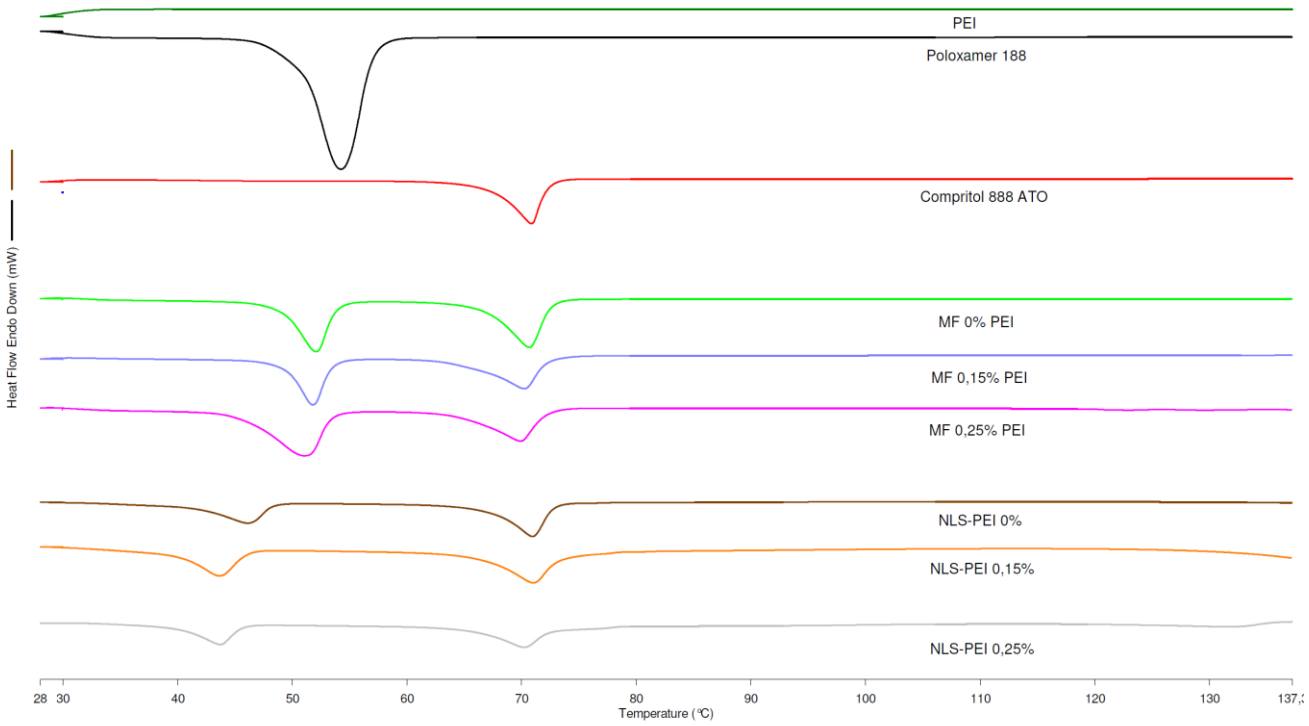
O diâmetro médio encontrado para as partículas analisadas por AFM é inferior aos valores de diâmetro determinados por DLS e NTA. Esta diferença está relacionada às diferenças dos princípios de cada técnica (BOYD, PICHAIMUTHU, CUENAT, 2011). Os valores de diâmetro encontrados pelas técnicas de DLS e NTA são calculados a partir da equação de Stokes-Einstein, a qual leva em consideração o diâmetro hidrodinâmico das partículas que compreende o diâmetro da partícula com sua capa de estabilização formada pela presença do tensoativo utilizado (MALVERN, 2016). Já o AFM corresponde a um microscópio que permite medir o diâmetro da nanopartículas sem a sua capa de estabilização (SITTERBERG et al., 2010).

4.1.4 Avaliação das NLS-PEIs por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

Foram realizadas análises de DSC para verificar o ponto de fusão dos componentes utilizados na formulação, o grau de cristalinidade, bem como avaliar se o processo de obtenção das NLS-PEIs alterou a cristalinidade de seus constituintes. O Compritol® 888 ATO é constituído por uma mistura de glicerídeos. Este lipídeo é conhecido por apresentar um polimorfismo complexo, pois a cristalinidade do material pode ser influenciada pela temperatura e condições de armazenamento (HAMDANI *et al*., 2003).

Os dados obtidos por DSC podem ser analisados na Figura 14. Estão presentes na Figura os picos de fusão da PEI livre, poloxamer 188, Compritol® 888 ATO, mistura física (Compritol® 888 ATO, poloxamer e PEI), NLS-PEI 0,0%, 0,15% e 0,25%.

Figura 14 - Termogramas da PEI, poloxamer 188 e Compritol® 888 ATO 888 ATO puros, misturas físicas (MFs) e NLS-PEI 0,0; 0,15 e 0,25%.



Observando-se a Figura 14 é possível inferir que não foi detectado ponto de fusão para a PEI livre, indicando assim que o material se encontra no estado amorfo, devido a sua estrutura altamente ramificada. Kang e colaboradores (2002) encontraram esse

mesmo resultado para a PEI livre quando buscaram sintetizar moléculas de poli (isoftalato de etileno).

Segundo Brubach e colaboradores (2007), o Compritol® 888 ATO apresenta ponto de fusão ao redor de 70 °C. Freitas e Muller (1999) avaliaram a faixa de fusão deste lipídeo, por DSC, verificando valores entre 63-77 °C, sendo o pico em 72,2 °C. Valor similar foi obtido no presente trabalho para o pico endotérmico do Compritol® 888 ATO (70,9 °C) (Figura 14 e Tabela 6). Nas formulações das NLS-PEIs, previamente preparadas e secadas por liofilização, também foi possível observar a presença de um pico endotérmico próximo a 70,96 °C para a NLS-PEI 0%; 71,06 °C para a NLS-PEI 0,15% e 70,21 °C para NLS-PEI 0,25% (Tabela 6), assim como na análise do Compritol® 888 ATO, o que é um pressuposto de que foi mantido certo grau de cristalinidade do lipídeo, após o preparo da formulação e a sua secagem. Segundo Brubach e colaboradores (2007), o resfriamento rápido do Compritol® 888 ATO conduz a uma recristalização na forma metaestável, forma que tende a se converter, a diferentes velocidades, na forma estável.

Assim como observado por Guhagarkar e colaboradores (2009), o poloxamer 188 apresentou ponto de fusão em 54,27 °C. Alguns trabalhos relatam o ponto de fusão em aproximadamente 56 °C, indicando que o resultado encontrado pela análise de DSC do tensoativo empregado está de acordo com os relatos da literatura (ANDREWS *et al.*, 2009; NEWA *et al*., 2007).

Nas formulações percebe-se um deslocamento do pico de fusão do poloxamer para 46,16 °C; 43,68 °C e 43,73 °C para NLS-PEI 0%, NLS-PEI 0,15% e NLS-PEI 0,25% respectivamente. Em estudo realizado por Kovacevic e colaboradores (2011) foram desenvolvidas NLS de Cutina® com Miglyol® 812 como porção lipídica e Plurol®Stearique WL1009 (PS) como tensoativo. Foi observado que, havia um alargamento da base do pico referente ao tensoativo utilizado na análise de DSC das NLS, indicando que o início do processo de fusão ocorria em temperaturas mais baixas além de uma diminuição da altura do pico. Este fenômeno foi considerado como uma alteração no perfil cristalino do tensoativo. Diante de tais resultados, a presença do primeiro pico endotérmico presente na curva de DSC das formulações NLS-PEI em temperatura inferior ao ponto de fusão do tensoativo permite pressupor que houve uma interação entre o poloxamer e o Compritol® 888 ATO e consequente alteração na estrutura cristalina do tensoativo.

Foi observado ainda, que para as nanopartículas contendo PEI, o pico de fusão do poloxamer foi menor do que nas NLS-PEI 0%, o que permite inferir que houve uma possível interação da PEI com o poloxamer, devido a uma provável interação das

aminas protonadas da PEI e os elétrons livres dos átomos de oxigênio das cadeias de polioxietileno e polioxipropileno do poloxamer. Essa interação foi também observada por Petersen e colaboradores (2002).

Tal interação PEI-Poloxamer, permite inferir que o polímero catiônico pode ser encontrado na superfície das nanopartículas. No entanto, para resultados mais conclusivos necessita-se de outras análises físico-químicas para corroborarem com os resultados do DSC.

Na mistura física (MF) contendo poloxamer + Compritol® 888 ATO e poloxamer + Compritol® 888 ATO + PEI observa-se somente a presença de dois picos, um referente ao poloxamer e outro ao Compritol® 888 ATO, demonstrando que não houve interação entre esses componentes na mistura física.

Para uma melhor observação, os valores da entalpia, do ponto de fusão e o índice de recristalização estão demostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros de fusão e índice de recristalização (IR) dos lipídeos e das NLS-PEIs.

Material	ΔH (J/g)	Ponto de fusão (°C)	IR (%)
Compritol® 888 ATO	96,56	70,90	100
NLS-PEI 0,00 %	39,11	70,46	81
NLS-PEI 0,15 %	33,99	70,85	70
NLS-PEI 0,25 %	27,97	71,29	58

Foi observada na Tabela 6 uma redução no valor da entalpia de fusão do lipídeo puro (96,56 J/g) para as NLS-PEIs. Esse resultado deve-se ao fato de que o lipídeo puro se encontra em um estado mais cristalino do que nas nanopartículas e quanto maior a organização do retículo cristalino de um material, maior será a energia necessária para superar as forças de coesão da estrutura e, portanto, maior será a entalpia de fusão (MARCATO, 2009). Assim, a presença de PEI interfere na organização lipídica das NLS-PEIs de forma concentração dependente.

No período de estocagem o lipídeo que compõe as nanopartículas pode sofrer uma transformação em sua estrutura cristalina, caracterizada pela transição da forma cristalina α (menos organizada) para a forma cristalina β (mais organizada). Esta mudança ocorre, pois, a forma β é energeticamente mais estável. Com o tempo, este aumento da transição para a forma β, resulta na formação de uma estrutura mais

cristalina e, consequentemente, ocorre a expulsão do ativo (ATTAMA *et al*., 2008). Foi observado que com a presença de PEI e aumento de sua concentração nas nanopartículas houve uma diminuição nos valores de ΔH e também no IR, isso demonstra que quanto maior a concentração de PEI menor é a cristalinidade das partículas. Além disso, partículas com baixo IR apresentam alta estabilidade, pois estruturas lipídicas amorfas ou com baixa cristalinidade não passam pela transição polimórfica de α para β durante o período de estocagem.

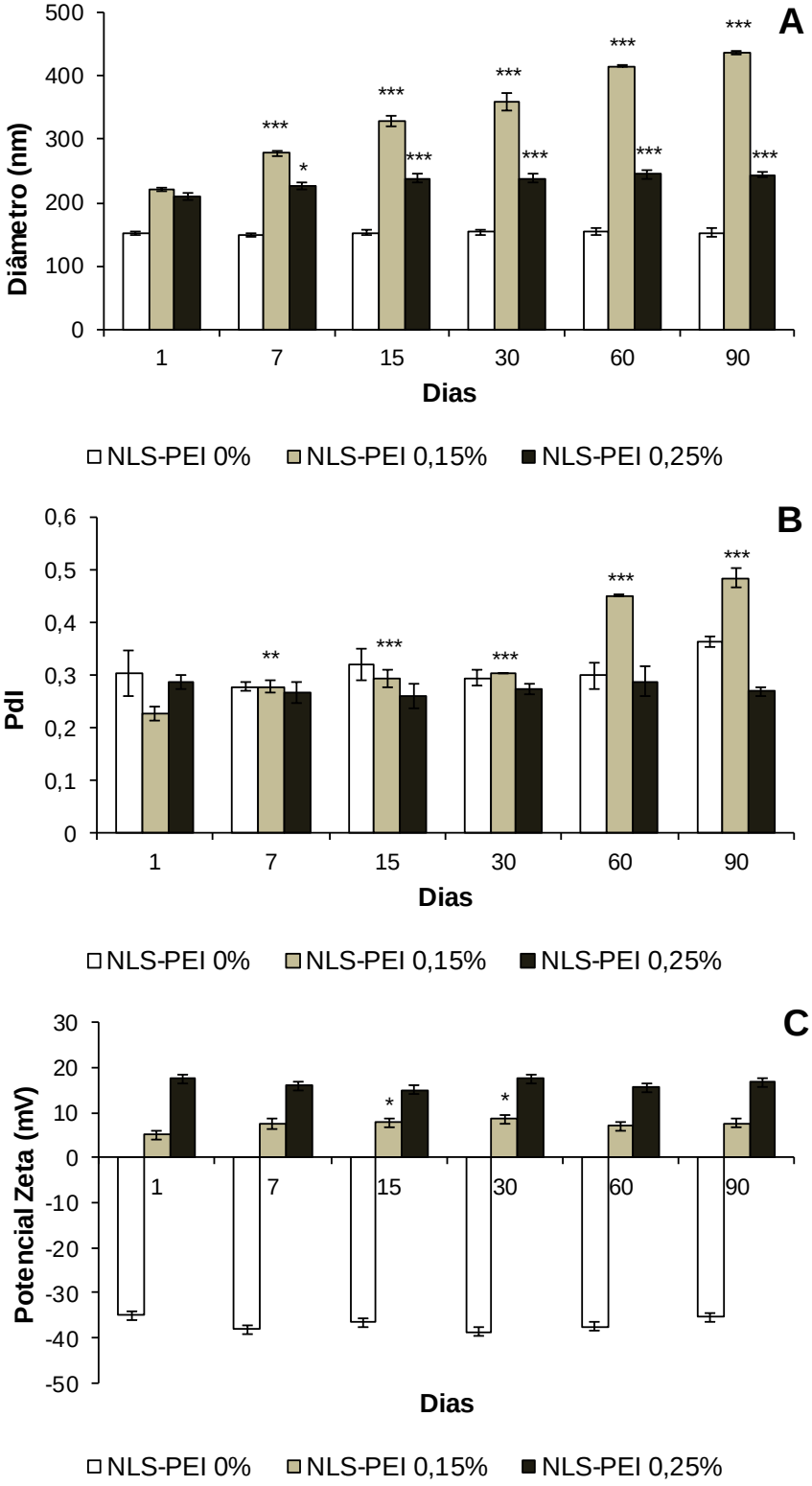
É possível concluir que a PEI está interagindo com todos os componentes das nanopartículas, localizando-se tanto no núcleo lipídico, por interação com o Compritol® 888 ATO, quanto na superfície das partículas, por interação com o poloxamer. O aumento proporcional do diâmetro médio e do potencial Zeta em relação ao aumento da proporção da PEI (Tabela 4), corrobora com esse resultado, permitindo inferir que a PEI se encontra na constituição da nanopartícula, com orientação para superfície, visto que a carga superficial das nanoparticulas sem a PEI é negativa.

4.1.5 Avaliação da estabilidade das NLS-PEIs

Os estudos de estabilidade preliminar consistem na realização dos testes da fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando diferentes formulações com durações reduzidas. Pelas condições em que é conduzido, o estudo não tem finalidade de estimar a vida útil do produto, mas auxiliar a triagem das formulações (BRASIL, 2004).

O ensaio foi realizado por um período de 90 dias a 4°C e a 30°C avaliando a estabilidade das nanodispersões. Os parâmetros avaliados foram diâmetro, índice de polidispersão, potencial Zeta e comportamento térmico [ponto de fusão e índice de recristalização (IR)]. Os valores obtidos para as NLS-PEIs armazenadas a 4 °C estão apresentados na Figura 15.

Figura 15 - Gráficos correspondentes ao diâmetro (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (C) das NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25% em função do tempo, armazenadas a 4°C. Resultados representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Turkey, *p < 0,05; **p < 0,01 ***p<0,001 em relação ao primeiro dia de análise.



De acordo com a Figura 15-A, é possível observar que não houve alterações no tamanho das NLS-PEIs 0,0 % e 0,25 %, no entanto, para as NLS-PEIs 0,15 % houve um aumento progressivo no diâmetro durante os 90 dias de estudo. Isso pode ter sido ocasionado devido ao baixo valor do potencial Zeta em módulo (PZ) dessas NLSs (Figura 15-C) em relação as demais formulações. A carga superficial ou potencial zeta de uma partícula indica a magnitude de interações de repulsão e atração eletrostática entre as partículas de dispersões aquosas. Portanto, o potencial zeta pode ser considerado um parâmetro chave para predizer a estabilidade de dispersões coloidais. Dentro deste contexto, acredita-se que valores de carga superficial igual ou maior que 30 mV em módulo são necessários para promover estabilidade eletrostática de dispersões coloidais (FREITAS AND MÜLLER, 1999).

No entanto, a estabilidade de nanopartículas não depende somente de repulsões eletrostáticas quando se faz uso de estabilizantes estéricos (CLOGSTON & PATRI, 2010). Assim, as NLS-PEIs 0,0% e 0,25% apresentam além da estabilidade por impedimento estérico proporcionada pelo tensoativo, possuem também estabilidade por repulsão de cargas (estabilidade elétrica), sendo, portanto mais estáveis durante longos períodos de estudo.

Na Figura 15-B, foi observado que, até o 30º dia de estudo, as NLS-PEIs apresentaram PdI abaixo de 0,3, o que é indicativo de sistemas com baixa polidispersão (NEMEN & LEMOS-SENNA, 2011). Logo após, foi observado, um aumento nos valores de PdI das NLS-PEIs 0,15% decorrente de uma provável aglomeração das nanopartículas durante o estudo, devido ao baixo valor do potencial Zeta.

Na análise do potencial Zeta das NLS-PEIs (Figura 15-C), não se observou alteração expressiva dos valores durante os 90 dias de estudo.

Os valores obtidos para os parâmetros de fusão e IR, das NLS-PEIs armazenadas à 4 °C, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores correspondentes à entalpia de fusão (ΔH J/g), ponto de fusão (PF °C) e índice de recristalização (IR %) das NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25% analisadas após 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de sua produção, armazenadas a 4°C.

Dias	NLS-PEI 0,0 %			NLS-PEI 0,15 %			NLS-PEI 0,25 %		
	ΔH J/g	PF (°C)	IR %	ΔH J/g	PF (°C)	IR %	ΔH J/g	PF (°C)	IR %
1	39,12	70,46	81,02	33,99	70,85	70,39	27,97	71,29	57,94
15	42,31	70,57	87,63	33,29	71,00	68,95	28,68	70,79	59,40
30	41,06	70,50	85,04	31,57	70,83	65,38	31,32	70,90	64,86
60	38,69	70,04	80,14	31,62	69,31	65,49	26,52	69,64	54,93
90	40,01	69,62	82,87	30,52	69,81	63,22	26,82	69,97	55,55

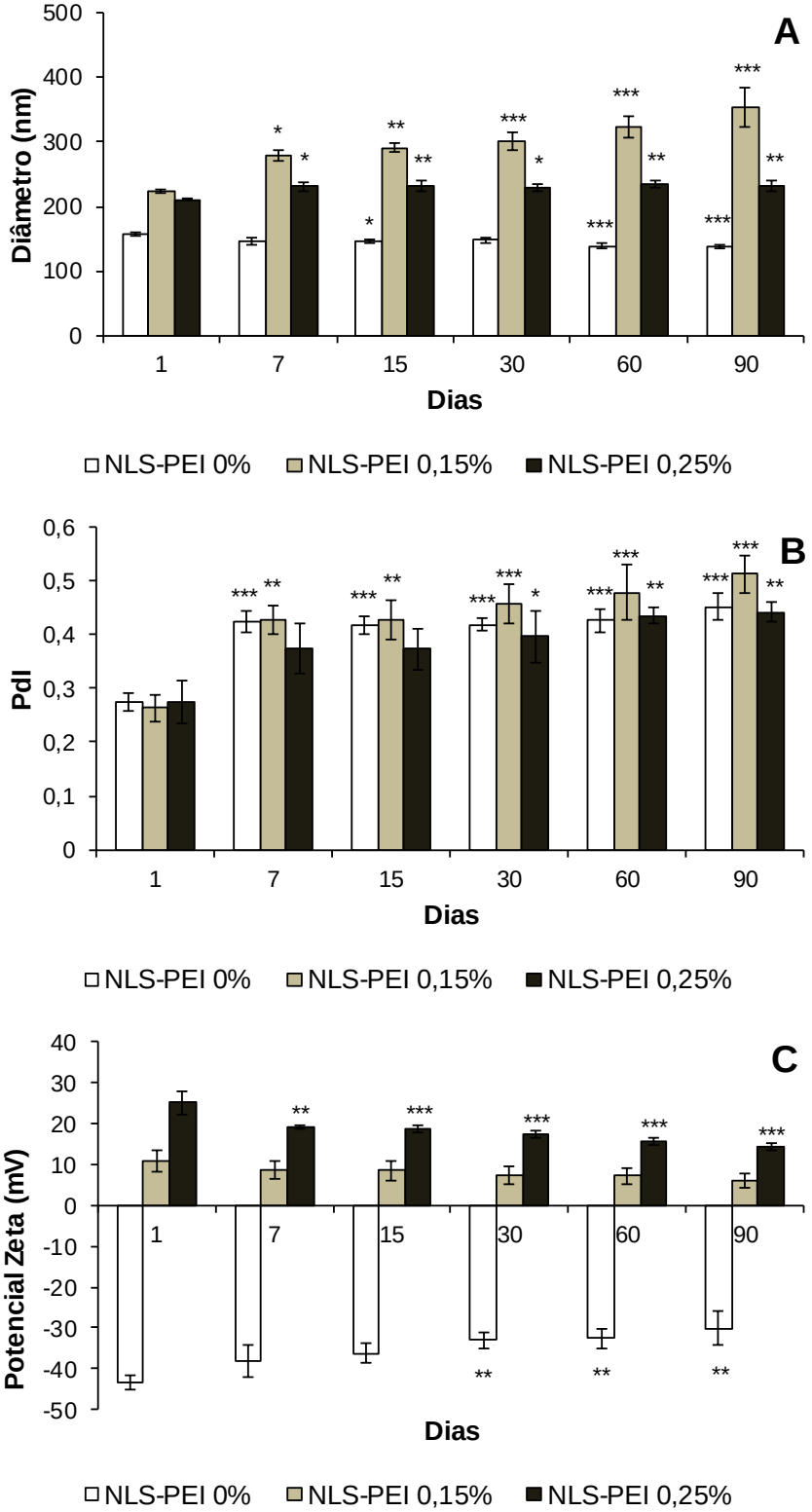
Não houve alteração significativa nos valores da entalpia de fusão e do índice de recristalinização, para as NLS-PEIs armazenadas a 4°C, o que permite inferir que apesar das NLS-PEIs 0,15% apresentarem indícios de agregação, não houve modificação na estrutura cristalina das nanopartículas durante os 90 dias de estudo.

Os valores obtidos para o diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta, das NLS-PEIs armazenadas à 30 °C, estão apresentados na Figura 16.

Foi observado na Figura 16-A um comportamento semelhante ao da Figura 15-A. Estabilidade nos valores de diâmetro das NLS-PEIs 0,0 % e 0,25 % e um aumento progressivo do tamanho das NLS-PEIs 0,15 % durante os 90 dias de estudos. Esse fator, como explanado anteriormente, deve-se à adicional estabilidade por carga que as NLS-PEIs 0,0% e 0,25% possuem.

Quanto aos valores de PdI, Figura 16-B, foi observado que do sétimo dia de estudo em diante, as NLS-PEIs apresentaram um aumento nos valores desse índice, no entanto, permaneceram constantes até o término do estudo. Na Figura 16-C foi vista uma leve redução nos valores em módulo do potencial Zeta das NLS-PEIs, no entanto, essa modificação nos valores não foi significativa o suficiente para alterar a estabilidade das nanoparticulas.

Figura 16 - Gráficos correspondentes ao diâmetro (A), índice de polidispersão (B) e potencial Zeta (C) das NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25% analisadas após 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de sua produção, armazenadas à 30°C. Resultados representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Turkey, *p < 0,05; **p < 0,01 ***p<0,001 em relação ao primeiro dia de análise.



Kushwaha e colaboradores (2013) avaliaram a estabilidade por 90 dias de NLSs armazenadas a 30°C utilizando-se de Compritol® 888 ATO como lipídeo e poloxamer 188 como estabilizante estérico para veiculação de Hidrocloridrato de Raloxifeno e observaram que não houve mudança significativa no diâmetro médio, no potencial zeta e na eficiência de encapsulação do fármaco, concluindo, portanto que a formulação trabalhada foi estável nas condições descritas.

Os valores obtidos para os parâmetros de fusão e IR, das NLS-PEIs armazenadas a 30 °C, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores correspondentes à entalpia de fusão (ΔH J/g), ponto de fusão (PF °C) e índice de recristalização (IR %) das NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25% analisadas após 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de sua produção, armazenadas a 30°C.

Dias	NLS-PEI 0,0 %			NLS-PEI 0,15 %			NLS-PEI 0,25 %		
	ΔH J/g	PF (°C)	IR %	ΔH J/g	PF (°C)	IR %	ΔH J/g	PF (°C)	IR %
1	39,12	70,46	81,02	33,99	70,85	70,39	27,97	71,29	57,94
15	41,24	69,09	85,40	27,96	70,07	57,90	26,04	70,23	53,94
30	38,60	69,19	79,96	31,45	70,16	65,13	21,93	70,83	45,41
60	42,51	69,11	88,05	13,95	70,63	28,89	17,08	71,09	35,37

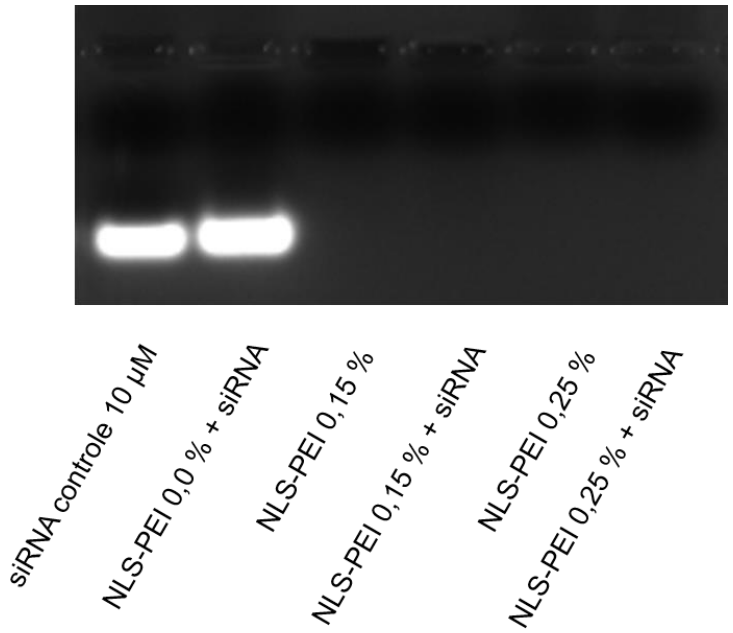
Analisando a Tabela 8 foi observado que há uma tendência na redução dos valores da entalpia e do índice de recristalização durante os 90 dias de estudos. Esse dado permite inferir que com o passar do tempo as partículas se organizaram para atingir um estado de baixa energia. Partículas com baixo IR apresentam alta estabilidade, pois estruturas lipídicas amorfas ou com baixa cristalinidade não passam pela transição polimórfica de α para β durante o período de estocagem. Essa diferença em relação às NLS-PEIs armazenadas a 4 °C, pode ter sido ocasionado devido à temperatura de armazenamento, onde as que estavam sob 30 °C receberam energia na forma de calor para modificação no seu estado de organização.

Dessa forma, a temperatura de 4 ºC foi considerada a melhor temperatura para armazenamento dessas partículas, pois houve uma maior manutenção das características das nanopartículas sendo, portanto, interessante para dar continuidade ao estudo.

4.1.6 Avaliação da eficiência de complexação do siRNA

A técnica de eletroforese em gel de agarose é comumente utilizada para avaliação do grau de complexação de siRNA em diferentes sistemas de liberação (SAWANT *et al*., 2012; NAVARRO *et al*., 2014; ZHU *et al*., 2014). Dessa forma, este ensaio foi realizado com o intuito de averiguar se as nanopartículas apresentavam a capacidade de complexar siRNA. Para isto, foi realizada a observação das bandas de migração no gel sob a luz ultravioleta e aquisição da imagem como mostra a Figura 17.

Figura 17 - Eficiência de complexação de NLS-PEIs 0,0; 0,15 e 0,25 %.



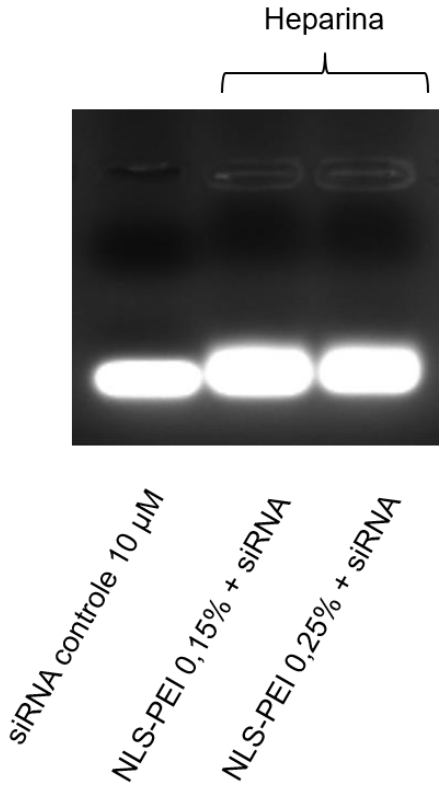
O siRNA livre, que tem carga negativa, migra pelo gel enquanto os complexos com carga positiva ou neutra, ficam no topo do gel (ZHOU *et al*., 2012).

Foi observada na Figura 17 que as NLS-PEIs, sem incorporação do siRNA, não interferiram na leitura do siRNA no gel, uma vez que não se observou presença de banda para estas amostras. Entretanto para as amostras NLS-PEI 0,0%-siRNA, foi observada a banda correspondente ao material genético não complexado. Isso pode ser explicado devido ao fato dessas nanopartículas apresentarem carga superficial negativa e assim não conseguirem interagir por meio de interações de *Van der Waals* com o siRNA que também possui carga negativa, devido aos grupamentos fosfatos. Desta forma, estes resultados permitem inferir que as nanopartículas sem PEI não complexam com o siRNA.

Observa-se ainda que as NLS-PEIs 0,15 % e 0,25 % complexaram o siRNA pois a formação do complexo dificulta a migração do siRNA, mantendo-o no poço. Como demonstrado anteriormente, estas nanopartículas apresentam carga superficial positiva devido a presença das aminas protonadas da PEI o que promoveu uma interação com o esqueleto fosfodiéster do siRNA, e consequentemente a complexação, impedindo assim a migração do siRNA no gel.

Após verificação da eficiência de complexação, foi avaliada a capacidade das nanopartículas liberarem o siRNA de forma intacta quando em presença de moléculas aniônicas como a heparina (Figura 18). Poliânions, tais como a heparina, pode dissociar os complexos de genes e dessa forma, levar á liberação do siRNA (QI *et al*., 2012).

Figura 18 - Eficiência de descomplexação de NLS-PEIs 0,15 e 0,25 % em presença de heparina.



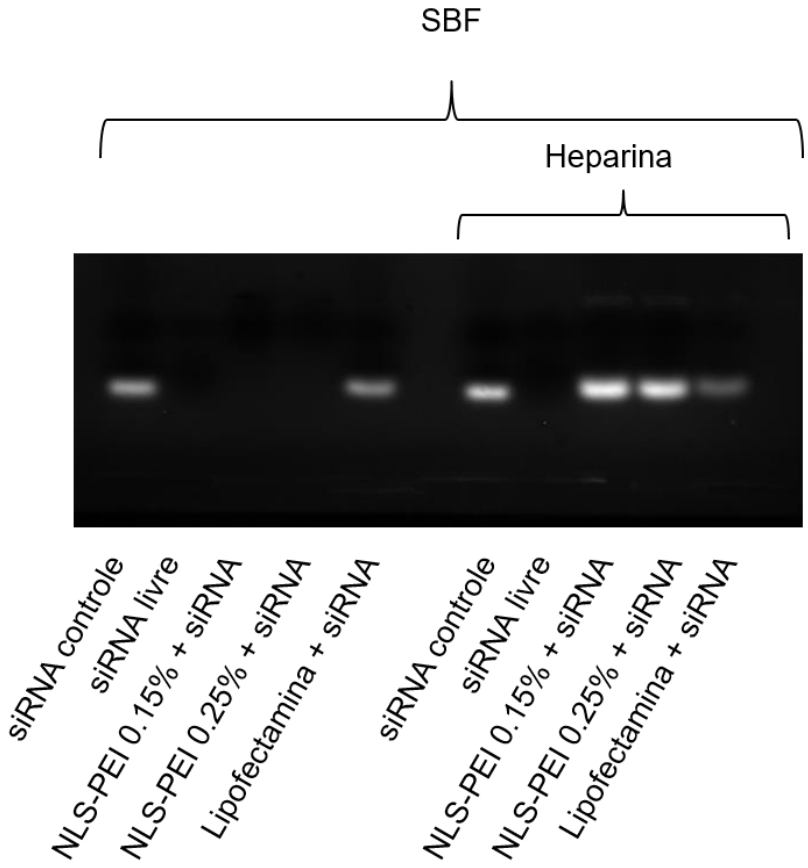
Analisando a Figura 18 foi percebido que quando em presença dos poliânions de heparina, houve uma competição, entre a heparina e o siRNA, pelas cargas positivas das aminas da PEI, dessa forma o siRNA foi descomplexado e identificado nas bandas da eletroforese. Esse resultado indica, que o siRNA foi liberado das nanopartículas de forma intacta, pois quando o material genético sofre degradações há aparecimento de

rastros no gel correspondentes aos fragmentos menores de siRNA, o que não foi observado no estudo (SAWANT *et al*., 2012). Essa condição é crucial para que o siRNA possa exercer o seu efeito na regulação da expressão de genes de interesse, demonstrando a efetiva utilização dessas NLS-PEIs como sistemas carreadores de siRNAs.

Qi e colaboradores (2012) e Zhou e colaboradores (2012) demonstraram resultados semelhantes quando desenvolveram copolímeros biodegradáveis para liberação de siRNA. Neste estudo, eles observaram que a liberação do siRNA dos complexos obtidos foi dependente da concentração de heparina no meio.

A estabilidade do siRNA em condições séricas foi examinada expondo os complexos à 25% de SBF durante 24 h, seguido de um teste de competição de poliânion de heparina durante 1 h antes da análise eletroforética (Figura 19).

Figura 19 - Avaliação da estabilidade do siRNA complexado às NLS-PEIs em condições séricas.



A susceptibilidade do siRNA à degradação de nucleases é uma questão fundamental para a aplicação terapêutica bem-sucedida do RNAi (XIONG et al., 2009). Após exposição ao soro durante 24 h, o siRNA livre (10 μM) não foi estável à 25% de SBF e foi completamente degradado o que demonstra sua susceptibilidade pela degradação sérica. Em contraste, o siRNA que estava complexado às NLS-PEIs e à lipofectamina foi liberado intacto após o ensaio de poliânion com a heparina, mostrando que esses carreadores protegem o siRNA da degradação sérica (Figura 19).

Kim e colaboradores (2013) apresentaram resultados semelhantes quando submeteram hidrogeis contendo nanopoliplexos e peptídeos de penetração celular em 50% de SBF para mimetizar condições séricas.

4.2 ESTUDOS *IN VITRO*

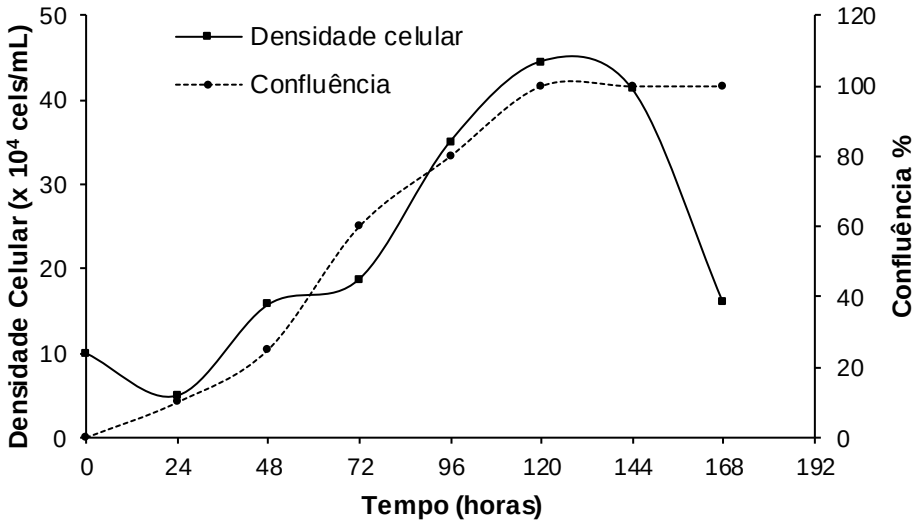
4.2.1 Curva de Crescimento de células HaCaT

Como a proposta do presente trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de liberação para aplicação tópica, os estudos celulares *in vitro* devem ser realizados em células da pele. Dessa forma, trabalhou-se com células de queratinócitos humanos da linhagem HaCaT.

O crescimento de uma cultura celular pode ser determinado por meio da sua curva de crescimento. Uma vez determinada a curva de crescimento para uma dada linhagem celular e para determinadas condições, é possível estimar a densidade à qual uma cultura deve estar antes de ser transferida para novo meio (ALVES & GUIMARÃES, 2010). Na Figura 20 encontra-se a curva de crescimento celular para células HaCaT.

A análise da Figura 20 permite identificar todas as fases de crescimento da célula em estudo. Fase *lag*, de 0 a 24 h: é a fase que se segue à inoculação da linhagem em novo meio nutritivo. É uma fase relativamente curta, caracterizada por não ocorrer crescimento ou mesmo decorrer um declínio da cultura. Fase exponencial, de 24 a 120 h: há um aumento gradativo tendendo ao máximo do número de células na cultura. Fase estacionária, de 120 a 144 h: é caracterizada por ausência de crescimento e em pouco tempo as células começam a sofrer alterações bioquímicas. Fase de morte, de 144 a 168 h: ocorre quando o metabolismo celular já não pode ser mantido. A fase exponencial é a que mais interessa para o presente projeto, visto que é onde as células encontram-se metabolicamente ativas, portanto a fase escolhida para trabalho.

Figura 20 - Curva de crescimento celular de células HaCaT.



Uma vez que a biologia celular se modifica em cada fase da curva, a importância de se estabelecer a curva de crescimento está no fato que se pode controlar o estágio em que as células serão trabalhadas, sendo possível a determinação do momento ideal do repique para um novo meio (ALVES & GUIMARÃES, 2010). Dessa forma o momento padronizado para o repique das células foi 70% de confluência, alcançado após cerca de 80 h do plaqueamento celular.

4.2.2 Ensaio da viabilidade celular em queratinócitos HaCaT e em fibroblastos 3T3

O uso da linhagem celular 3T3 é considerado um padrão para o estudo da citotoxicidade, particularmente, quando os compostos são destinados para administrações intravenosas ou tópicas. Enquanto isso, a célula HaCaT é utilizada para complementar os estudos de compostos destinados a administração tópica (SEVERINO et al., 2015).

Os componentes das nanopartículas em estudo como lipídeos e tensoativos são aceitos quando em contato com meios biológicos, porém há a necessidade de avaliação da combinação desses componentes na forma de nanocarreadores, devido a grande área superficial, capacidade de reatividade de superfície, aglomeração e sedimentação, o que influencia em estudos de internalização celular e toxicidade. Além disso, a concentração e a natureza dos lipídeos também podem afetar a viabilidade celular (DAL PIZZOL et al., 2014; JORIS et al., 2013).

Dessa forma, as NLS-PEIs foram avaliadas em ensaio de viabilidade celular para verificar sua ação sobre células representativas da pele como queratinócitos e fibroblastos e assim identificar a concentração de nanopartículas adequada para se trabalhar com as células. Vários estudos têm sido feitos para verificar a citocompatibilidade de diferentes formulações em várias culturas de células (VITONYTE et al., 2017; SEVERINO et al., 2015; LIN et al., 2013). Os testes de toxicidade de formulações em cultura de células vêm se tornando, portanto, uma analise fundamental nos estudos recentes (JORIS et al., 2013). A avaliação da citotoxidade foi realizada pelo ensaio de redução da resazurina.

O ensaio da Resazurina (também conhecida como Alamar Blue®) oferece uma medição simples, rápida e sensível da viabilidade celular. As células vivas metabolicamente ativas são capazes de reduzir o corante Resazurina, de cor azul e não fluorescente, à resorufina de cor rosa, fluorescente e que não precipita ao ser reduzida. Essa redução é atribuída a diferentes sistemas enzimáticos oxidorredutase que utilizam NAD(P)H como doadores de eletróns primários. A fluorescência é diretamente proporcional ao número de células viáveis. A resofurina também pode ser determinada por absorbância a 570 nm (NAKAYAMA et al., 1997; CZEKANSKA, 2011).

Os resultados obtidos com os ensaios das formulações dos sistemas contendo 0,0%, 0,15% e 0,25% de PEI foram analisados de acordo com a viabilidade celular em função das concentrações das nanopartículas. A Figura 21 e a Figura 22 mostra os resultados de viabilidade obtidos, em células HaCaT e 3T3 respectivamente, variando a diluição das nanopartículas no meio de 1:50 (v/v) até 1:1600 (v/v), para um tratamento de 4 h (Figura 21-A eFigura 22-A) e 24 h (Figura 21-B e Figura 22-B).

Fez-se uma análise inicial de 4 h de tratamento, pois é relatado que esse tempo é suficiente para as células realizarem a captação de nanopartículas (KONG et al., 2011; ZHOU et al., 2012). Dessa forma, observa-se, Figura 21-A, que todas as NLS-PEIs analisadas em todas as diluições apresentaram uma viabilidade em células HaCaT acima de 90%, demonstrando ser mais resistente do que as células 3T3 (Figura 22–A) onde observou-se um efeito dose-dependente e a viabilidade foi acima de 90% apenas na diluição 1:800 (v/v) em diante. Vitonyte et al., (2017) observaram efeito semelhante quando avaliaram a viabilidade de nanovesículas carreando ácido gálico e resveratrol em células HaCaT e 3T3.

Figura 21 - Viabilidade celular das NLS-PEIs em queratinócitos (HaCaT), com 4 h (A) e 24 h (B) de tratamento. Resultados de viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão.

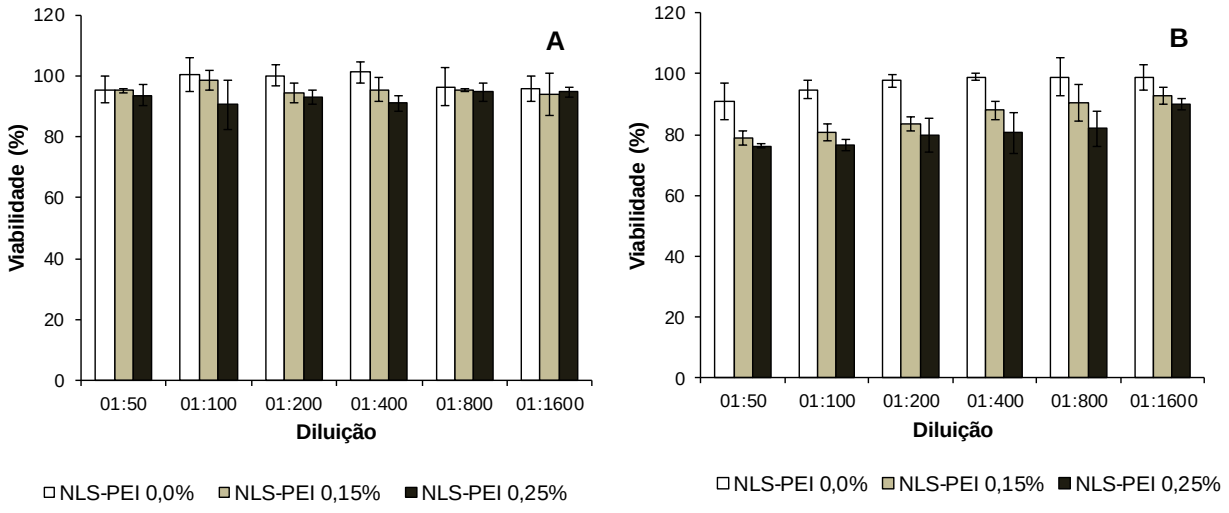
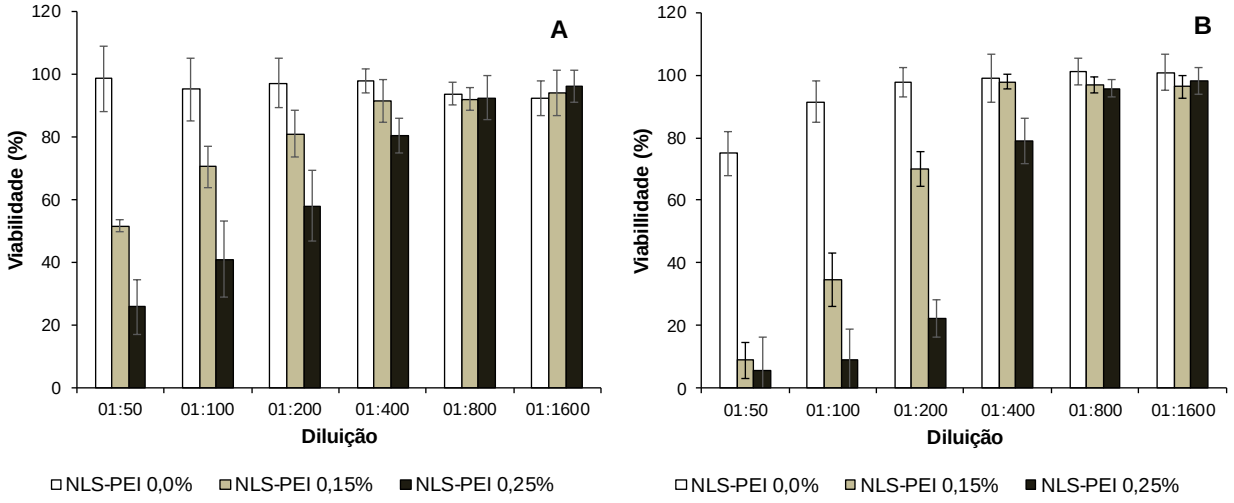


Figura 22 - Viabilidade celular das NLS-PEIs em fibroblastos (3T3), com 4 h (A) e 24 h (B) de tratamento. Resultados de viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão.



Para investigar melhor o efeito das NLS-PEIs às células, foi realizado o tratamento por 24 h (Figura 21-B e Figura 22-B). Neste estudo foi observado, tanto para a HaCaT quanto para a 3T3, que quanto maior a concentração das NLS-PEIs maior foi a morte celular, ou seja, foi observado um efeito dose dependente. Isso porque essas células sofreram tanto efeito físico da sedimentação dessas partículas de baixa

densidade sobre a membrana celular, quanto efeito químico pela constituição das mesmas. Khanbeigi e colaboradores (2012) observaram efeito semelhante em macrófagos quando consideraram a dose de partículas aplicada e entregue às células.

Foi observada ainda, uma correlação inversa entre a quantidade de PEI nas nanopartículas e a viabilidade celular, ou seja, quando a concentração desse polímero aumentou, a viabilidade diminuiu. Este resultado está relacionado com a toxicidade do PEI que, como descrito na literatura, altas quantidades de PEI são citotóxicas devido a interações eletrostáticas com a membrana celular (LIANG et al., 2008; VICENTINI et al., 2013a, b; BORGHETI-CARDOSO et al., 2015).

Para que um composto seja considerado citotóxico, a porcentagem de células viáveis precisa ser inferior a 70% em relação ao controle; sendo que valores acima de 70% de viabilidade celular são considerados não citotóxicos em relação ao teste celular (SEVERINO et al., 2015). Dessa forma, foi padronizada a diluição de 1:400 (v/v) para as células HaCaT e 1:800 (v/v) para as células 3T3, para a realização dos demais ensaios com células, pois é uma concentração intermediária que apresentou viabilidade celular acima de 70 % para todas as amostras.

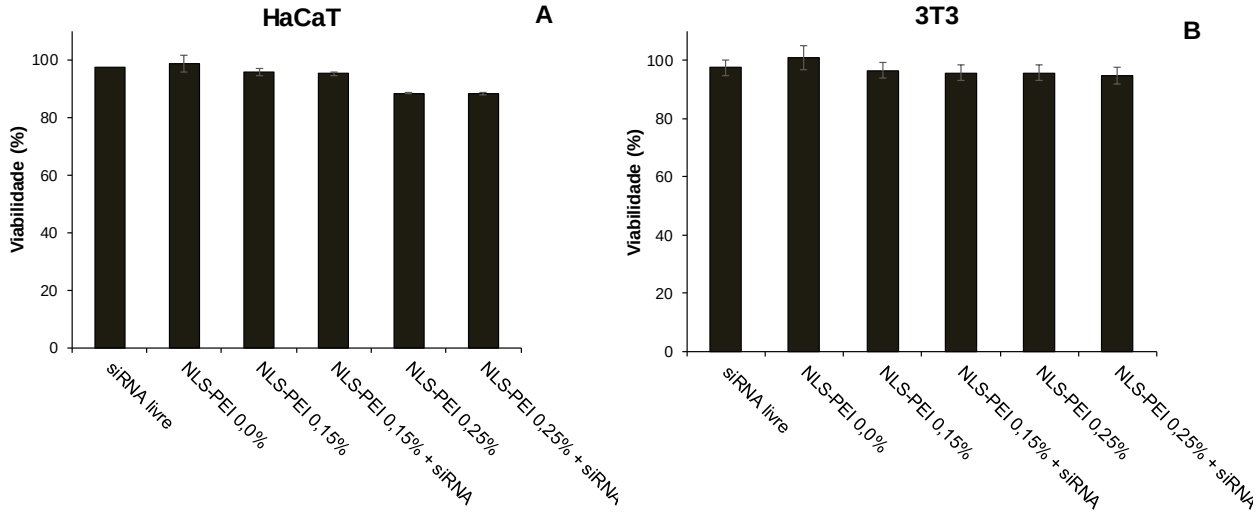
A dose de exposição de partículas expressas em número por volume é a melhor medida de dose (JORIS et al., 2013). Dessa maneira, a concentração de nanopartículas em suspensão foi determinada por NTA. A partir dos dados obtidos na Tabela 5, encontrou-se a concentração de nanopartículas nas diluições padronizadas de 1:400 (v/v) e 1:800 (v/v) (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentração de NLSs na diluição 1:400 (HaCaT) e 1:800 (3T3).

NLS-PEIs (%)	**Número de partículas/mL aplicadas nas células**	
	1:400	**1:800**
0,00	$5,75 \times 10^{10}$	$2,87 \times 10^{10}$
0,15	$6,35 \times 10^{10}$	$3,17 \times 10^{10}$
0,25	$6,55 \times 10^{10}$	$3,27 \times 10^{10}$

Padronizada a concentração de trabalho, avaliou-se a viabilidade das nanopartículas complexadas com siRNA em queratinócitos HaCaT e em fibroblastos 3T3 por 24 h (Figura 23).

Figura 23 - Viabilidade celular das NLS-PEIs sem/com siRNA em queratinócitos HaCaT (A) e em fibroblastos 3T3 (B) em 24 h de tratamento pelo método de redução da resazurina. Resultados de viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3).



Analisando a Figura 23 é possível verificar que não houve modificação da viabilidade celular após o tratamento com as NLS-PEIs contendo siRNA, uma vez que o siRNA utilizado para essas análises foi um siRNA inespecífico. Depieri (2012) também descreveu resultado semelhante quando avaliou a citotoxidade de nanodispersões de cristais líquidos carreando siRNA em células de fibroblastos (L929).

4.2.3 Estudos de captação celular

4.2.3.1 Avaliação da captação celular por Citometria de Fluxo

Captação celular eficiente representa um dos principais obstáculos para uso terapêutico do siRNA e, portanto, a avaliação deste parâmetro é fundamental (VADER et al., 2010). Isso porque a membrana plasmática das células é uma estrutura dinâmica com característica lipofílica e grupos de fosfolipídios aniônicos. Como resultado, há uma restrição à entrada de moléculas grandes, hidrofílicas e eletricamente carregadas (grupos fosfatos aniônicos), como por exemplo moléculas de RNA (ALIABADI, et al., 2012; KHALIL et al., 2006; XU, GANESH, AMIJI, 2012; CHONG, et al., 2013). Estudos tem mostrado que a liberação de siRNA livre resulta em baixas taxas de silenciamento gênico *in vitro* e *in vivo* como resultado de uma captação celular ineficiente e ressaltam a

importância de veiculação do siRNA em sistemas de liberação capazes de complexar e proteger o siRNA do ataque enzimático, bem como promover sua captação celular (REISCHL; ZIMMER, 2009; WHITEHEAD, LANGER, ANDERSON, 2009; KREBS, ALSBERG, 2011).

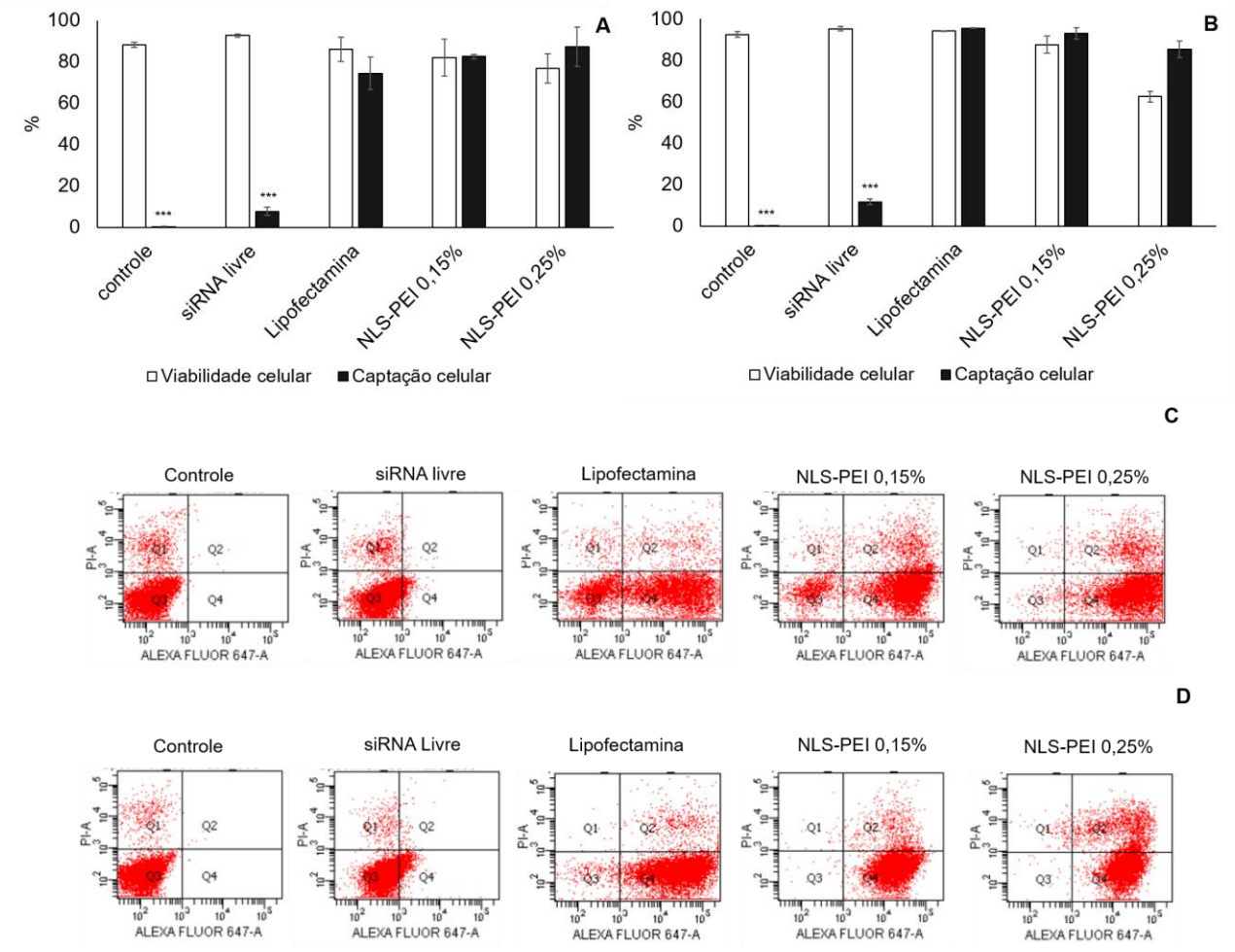
Para avaliar a capacidade de um sistema em promover a internalização celular do siRNA, é importante usar técnicas que determinam quantitativamente o siRNA dentro da célula após a transfecção. A análise quantitativa pode ser obtida usando siRNA marcado com elementos radioativos (OVERHOFF; WUNSCHE; SCZAKIEL, 2004; WOLFRUM et al., 2007). Porém, trabalhar com material radioativo requer pessoal treinado e laboratório preparado e autorizado. O uso de q-PCR também tem sido descrito para quantificação de siRNA presente dentro da célula (LIU et al., 2009), porem esta técnica requer materiais caros e otimização do processo. Por outro lado, siRNA marcados com marcadores fluorescentes são comercialmente disponíveis, baratos, de fácil detecção e, portanto, frequentemente são usados para quantificar ou visualizar a internalização celular (VADER et al., 2010). Assim, utilizou-se siRNA com marcador fluorescente (Alexa 647) e a capacidade das NLS-PEIs em promover a captação celular do siRNA foi avaliada e quantificada por citometria de fluxo.

Com base nos resultados obtidos no estudo de viabilidade celular, foi padronizada a concentração de NLS-PEIs no meio para a realização deste estudo, sendo que para as células HaCaT foram utilizadas as concentrações de partículas de 5,75 x 10^{10} NLS-PEIs 0,0%/mL; 6,35 x 10^{10} NLS-PEIs 0,15%/mL e 6,55 x 10^{10} NLS-PEIs 0,25%/mL. Já para as células 3T3 as concentrações de partículas utilizadas foram 2,87 x 10^{10}; 3,17 x 10^{10} e 3,27 x 10^{10} partículas/mL para as NLS-PEIs 0,0%; 0,15% e 0,25%, respectivamente (Tabela 9).

Após tratamento das células por 4h e 24h, realizou-se a avaliação da internalização das NLS-PEIs complexadas com o siRNA-Alexa fluor® 647, a intensidade média de fluorescência nas células foi usada com uma medida de quantidade de siRNA-Alexa internalizado. Essa abordagem é amplamente utilizada para comparar a endocitose de siRNA complexado à diferentes nanocarreadores (VADER et al., 2010).

Avaliou-se a viabilidade celular utilizando iodeto de propídeo (PI). O PI é um padrão para viabilizar a citometria de fluxo e é usado para distinguir células viáveis das não viáveis. Células viáveis excluem o PI da interação com a membrana, enquanto que a membrana de células mortas ou danificadas pode ser penetrada pelo PI (KONG *et al*., 2011). A Figura 24 apresenta os resultados obtidos para 4 e 24h de tratamento em células HaCaT.

Figura 24 - Captação e viabilidade celular; e dot plot representativo do siRNA-Alexa livre, complexo formado entre lipofectamina e o siRNA Alexa e a NLS-PEI e o siRNA-Alexa determinado por citometria de fluxo em céulas HaCaT em 4 h de tratamento (A e C) e 24 h de tratamento (B e D). siRNA-Alexa na concentração final de 40 pmol/poço. Resultados de captação e viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Turkey, ***p<0,001 em relação ao tratamento com lipofectamina.



Analisando a Figura 24, verifica-se uma captação celular de 82,63 % para NLS-PEI 0,15% e de 87,37 % para a NLS-PEI 0,25%. A captação celular das NLS-PEIs foi maior do que a da lipofectamina (74,6%), que é o controle positivo. A lipofectamina é um lipossoma catiônico disponível comercialmente como carreador de genes, em que sua alta eficiência de transfecção foi comprovada em diversos modelos celulares (DALBY *et al*., 2004; CARDARELLI et al., 2016). Apesar da diferença na captação celular da

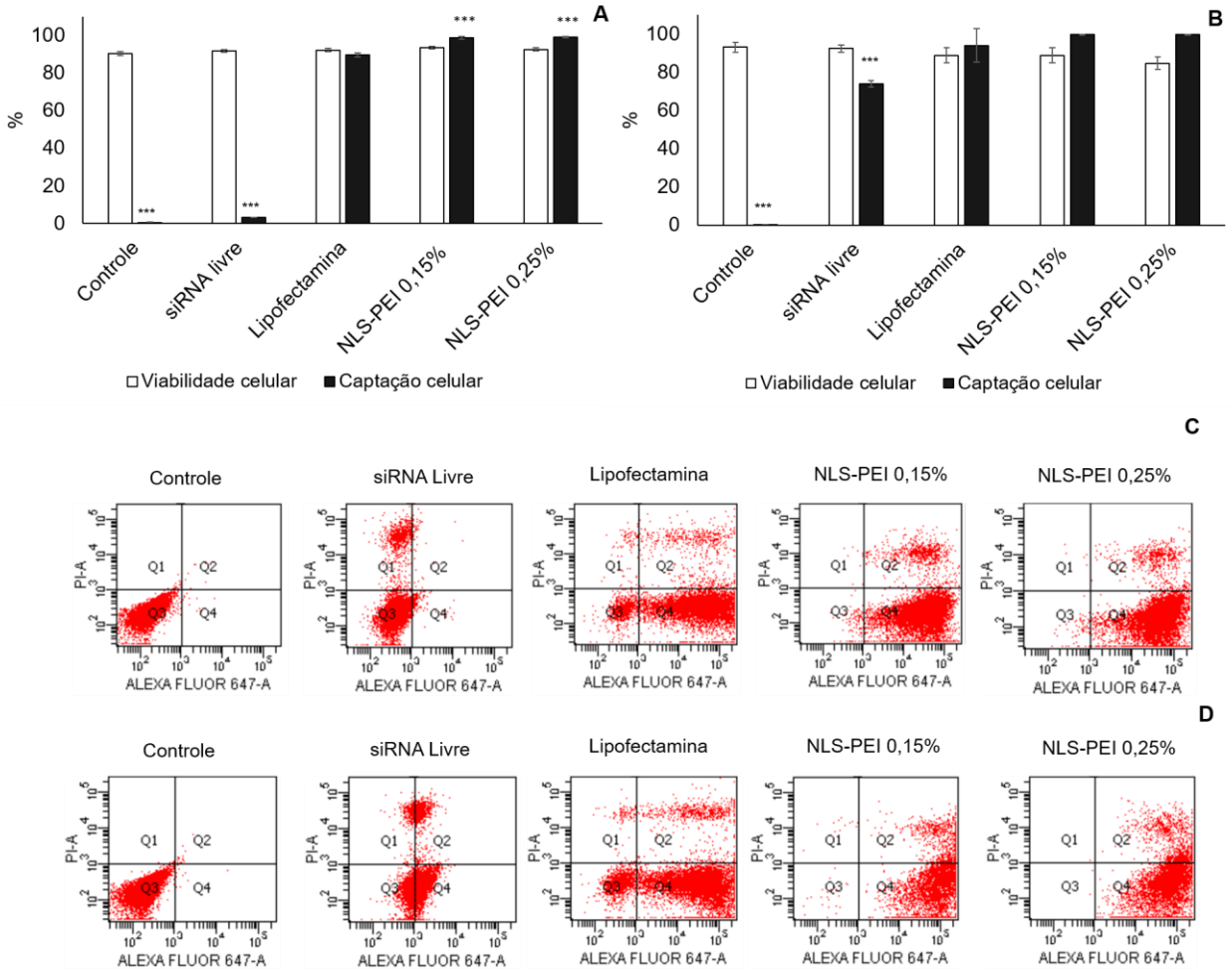
lipofectamina com as nanopartículas não ter sido estatísticamente significante, este resultado demonstra que as nanopartículas são tão eficientes quanto o controle postivo comumente utilizado em ensaios de terapia gênica e, portanto, são sistemas relevantes para este tipo de terapia. Além disso, observa-se que a captação celular das NLS-PEIs foi maior do que o siRNA livre (4 h e 24 h), demonstrando claramente a eficiência de transfecção das nanopartículas propostas no presente trabalho. Este aumento da captação celular das NLS-PEIs e da lipofectamina está associado à sua carga positiva, já que nanopartículas com superfície catiônica são facilmente internalizadas por meio de endocitose devido a carga oposta a membrana celular (QI et al., 2012).

A Figura 25 apresenta os resultados obtidos para 4 e 24 h de tratamento em células 3T3.

Após 4 h de tratamento (Figura 25 A e C), foi observado um resultado semelhante ao observado com as células HaCaT, ou seja, maior captação das NLS-PEIs 0,15 e 0,25% (98,77% e 99,10%, respectivamente) quando comparado com a captação da lipofectamina (89,53%). Após 24 h de tratamento, foi observado (Figura 25 B e D) que a captação celular permaneceu alta para todos os complexos, sendo 94,10% para a lipofectamina, 99,70% para NLS-PEI 0,15% e 99,93% para NLS-PEI 0,25%. Um aumento da captação celular também foi observado para o siRNA Alexa livre (74,10%), o que demonstra que a captação é diretamente dependente da linhagem celular.

A alta captação celular observada das NLS-PEI na célula HaCaT e 3T3 está diretamente relacionada com o polímero catiônico PEI. Dentre os adjuvantes catiônicos utilizados para o carreamento de ácidos nucleicos, a PEI é bastante utilizada devido sua capacidade de promover altas taxas de transfecção celular decorrente de sua estrutura molecular com grupamentos amina protonáveis. Em pH fisiológico, cerca de 20% destes grupos estão protonados permitindo ligações não covalentes com siRNAs e formação de complexos estáveis com elevada capacidade de transfecção celular (AKINC et al., 2005; GUNTER et al., 2011). Este resultado também pode ser atribuído à porção lipídica da nanopartículas. Nanopartículas lipídicas penetram efetivamente em membranas biológicas através da via mediada pelo receptor porque os lipídios são os componentes em maior quantidade nas membranas celulares (NASERI et al. 2015).

Figura 25 - Captação e viabilidade celular; e dot plot representativo do siRNA-Alexa, complexo formado entre lipofectamina e o siRNA Alexa e a NLS-PEI e o siRNA-Alexa determinado por citometria de fluxo em céulas 3T3 em 4 h de tratamento (A e C) e 24 h de tratamento (B e D). siRNA-Alexa na concentração final de 40 pmol/poço. Resultados de captação e viabilidade representam a média de três experimentos independentes (n=3) ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Turkey, ***p<0,001 em relação ao tratamento com lipofectamina.



Como a maior captação celular foi observada em 24 h de tratamento, esse foi o tempo de tratamento escolhido para a realização da próxima análise.

4.2.3.2 Avaliação da captação celular por Microscopia Confocal

A técnica de microscopia confocal a laser emprega a microscopia para a visualização em alta resolução de amostras fluorescentes devido à iluminação pontual e

propriedades de detecção (ROSSETTI, DEPIERI, BENTLEY, 2013). Esta técnica tem capacidade de identificar células e componentes celulares de amostras frescas ou fixadas, que podem ser coradas com diferentes tipos de sondas fluorescentes. Ainda permite a visualização das amostras em vários níveis de profundidade produzindo imagens em seções transversais (CLAXTON, FELLERS, DAVIDSON, 2006).

Essa técnica é habitualmente qualitativa, pois envolve a visualização das células transfectadas por microscopia confocal. Portanto, esta técnica foi realizada para observar a distribuição do siRNA nas células e para demonstrar a ocorrência de internalização das NLS-PEIs pelos queratinócitos e fibroblastos através dos resultados obtidos por citometria de fluxo. A Figura 26 apresenta as fotomicrografias obtidas dos queratinócitos HaCaT e a Figura 27 os fibroblastos 3T3, tratados por 24 h com as formulações.

Analisando a Figura 26 e a Figura 27, é possível verificar em azul o núcleo das células corado pelo DAPI e em vermelho a fluorescência do siRNA-Alexa fluor® 647. Para os queratinócitos e os fibroblastos que foram tratados com o siRNA-Alexa livre, não foi possível visualizar fluorescência vermelha dentro das células, pois como discutido no ítem 4.2.3.1, a membrana plasmática das células restringe a entrada de moléculas grandes, hidrofílicas e eletricamente carregadas como as moléculas de RNA (ALIABADI et al., 2012; KHALIL et al., 2006; XU, GANESH, AMIJI, 2012; CHONG, et al., 2013). Este resultado demonstra a ineficiência de transfecção do siRNA livre.

O padrão pontuado em vermelho nas Figuras 26 e 27, indica acúmulo dos complexos em vesículas endocíticas (OLIVEIRA et al., 2007). Para as NLS-PEIs é observado uma redução do padrão pontuado em vermelho sugerindo uma possível liberação das moléculas do siRNA e/ou do complexo siRNA-NLS-PEI dos endossomos, provavelmente devido a ruptura ou escape das vesículas endossiticas.

Figura 26 - Fotos representativas da microscopia confocal de queratinócitos HaCaT tratados com siRNA Alexa 647 livre, lipofectaminada e as NLS-PEIs. O núcleo das células foi corado com DAPI (azul) e em vermelho o siRNA-Alexa complexado às nanoestruturas internalizado.

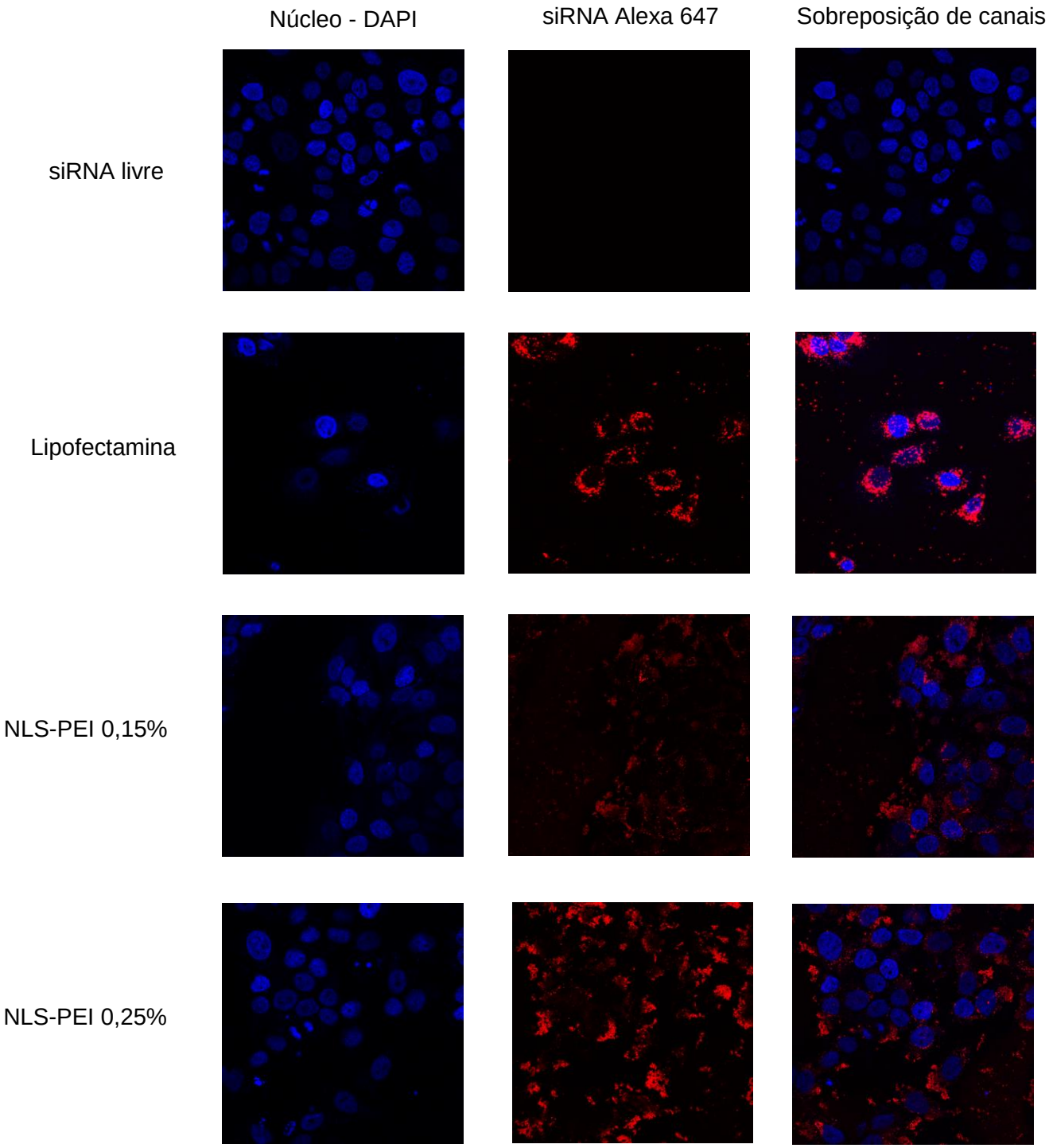
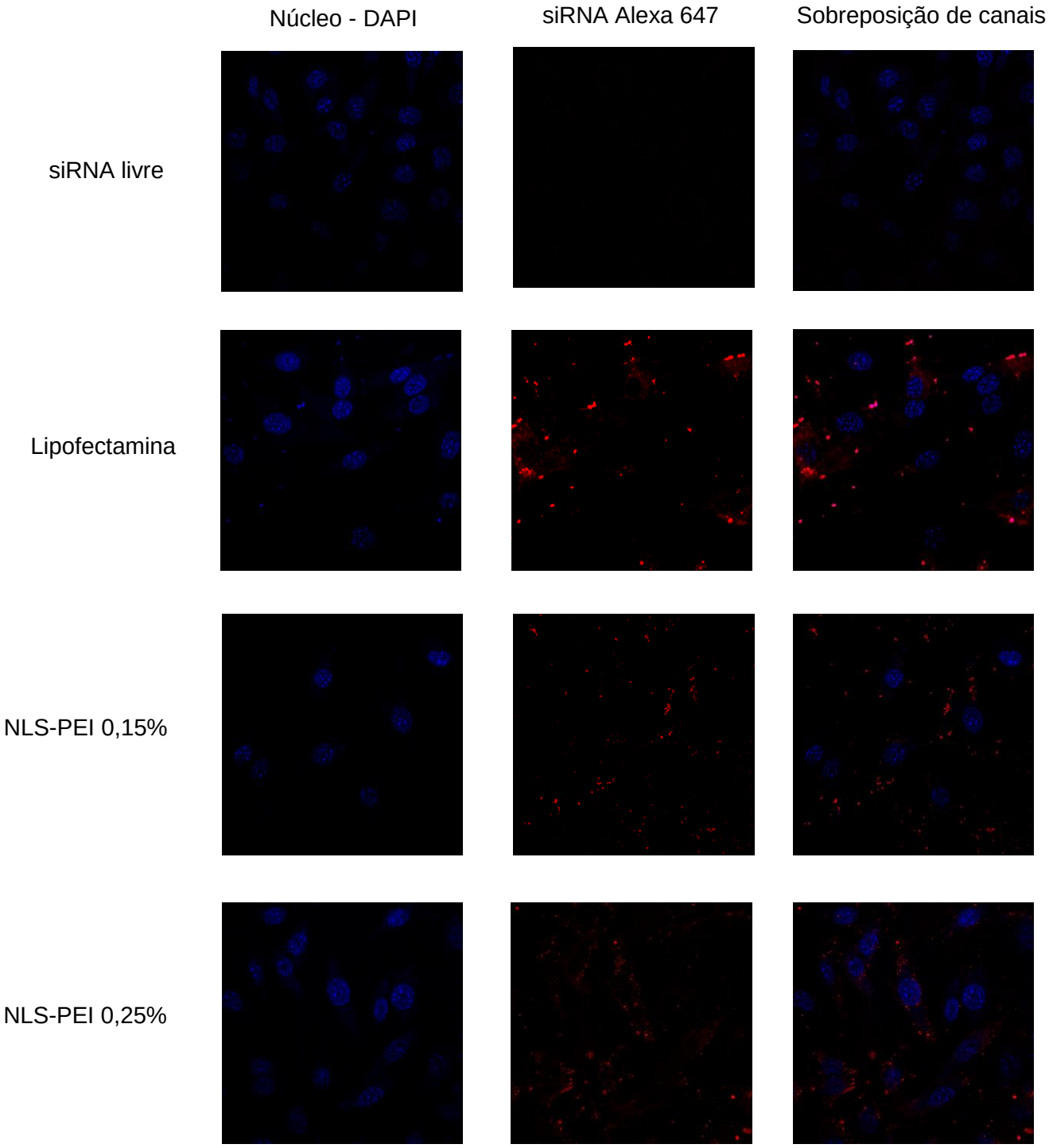


Figura 27 - Fotos representativas da microscopia confocal de fibroblastos 3T3 tratados com siRNA Alexa 647 livre, lipofectaminada e as NLS-PEIs. O núcleo das células foi corado com DAPI (azul) e em vermelho o siRNA-Alexa complexado às nanoestruturas internalizado.



Essas imagens corroboram com os resultados da citometria de fluxo e demonstram que a capacidade de transfecção celular das NLS-PEIs foi mais expressiva que a Lipofectamina, afirmando o potencial desses sistemas como vetores não-virais na terapia gênia de doenças cutâneas. Vader e colaboradores (2010) demonstraram resultados semelhantes quando compararam *uptake* de siRNAs complexados à poliplexos e lipoplexos por diferentes técnicas usadas para determinar sinal de fluorescência como a citometria de fluxo e a microscopia confocal.

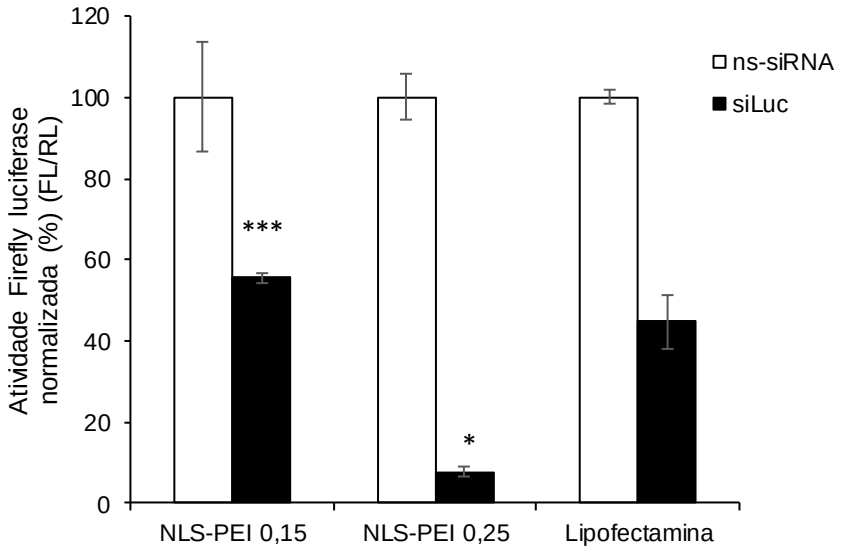
4.2.4 Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HaCaT pelo siLuc liberado das NLS-PEIs.

Demonstrado por citometria de fluxo e microscopia confocal que o siRNA veiculado pelas NLS-PEIs foi endocitado, foi avaliado se o siRNA internalizado pelas células estava disponível no citoplasma e era capaz de se associar ao RISC e promover o silenciamento gênico de uma proteína especifica. A eficácia do siRNA em induzir o silenciamento gênico só pode ser medida experimentalmente com base na inibição da expressão de um gene alvo (HUNG et al., 2006). Nesse caso, a avaliação do silenciamento gênico foi feita com gene modelo exógeno (Firefly/Renilla luciferase).

O silenciamento de genes que expressam luciferase é medido pela capacidade da luciferase em transformar energia química em energia luminosa ao catalisar reações biológicas, tendo a luciferina como substrato (ALLARD; KOPISH, 2008). Muitos estudos avaliam a atividade de luciferase como indicador de sucesso de silenciamento gênico (BORGHETI-CARDOSO, 2017; LI et al., 2010; BOUDREAU et al., 2009). A avaliação do silenciamento gênico medido pela atividade de luciferase fornece resultados confiáveis e de fácil obtenção por combinar a simplicidade e sensibilidade do ensaio com luciferase com a proteína de referência (CONDE et al., 2015).

Esse estudo foi realizado utilizando células HaCaT que expressavam o gene firefly luciferase. A Figura 28 mostra que todos os sistemas liberaram efetivamente o siLuc nas células HaCaT, reduzindo significamente a expressão da Firefly Luciferase comparado com as células tratadas com o ns-siRNA (siRNA não especifico) ($p < 0.05$).

Figura 28 - Porcentagem de inibição da atividade de Firefly luciferase normalizada por Renilla luciferase após tratamento das células HaCaT com siLuc (siRNA luciferase) e ns-siRNA (siRNA não específico) (100 pmol/1x105 células) complexado com as NLS-PEIs e Lipofectamina. ***p<0,001 e *p<0.05 comparado as células tratadas com complexo siLuc-lipofectamina (100 pmol/1x10^5 células), n=3.



Renilla luciferase é comumente usada como controle de transfecção (KALINOWSKI et al, 2012. Desta forma, a atividade da firefly luciferase, nas células tratadas com siRNA específico para firefly luciferase (siLuc) e siRNA não-específico (ns-siRNA) foi normalizada pela atividade da renilla luciferase. A redução na expressão da Firefly luciferase foi maior nas células tratadas com NLS-PEI 0,25% (92,3%) complexados com o siLuc do que com a NLS-PEI 0,15% (44,5%) e a Lipofectamina (55,31%). Dessa forma, dentre os sistemas estudados, NLS-PEI 0,25% mostrou maior atividade de silenciamento.

Estes resultados mostram que a PEI é o componente da formulação responsável pela veiculação efetiva do siRNA. Devido a presença do PEI nas nanopartículas a liberação dos ácidos nucleicos do endossoma ocorre por um processo denominado “efeito esponja de prótons”. Após endocitose, há uma acidificação do endossoma, esse processo protona as aminas do polímero que juntamente com o influxo de íons cloro gera um desequilíbrio osmótico, resultando em um influxo de água para o reestabelecimento do equilíbrio. Esse processo promove a ruptura do endossomo e liberação do seu conteúdo para o citoplasma, inibindo a degradação do ácido nucleico (BEYERLE et al., 2011; GÜNTHER et al., 2011).

4.2.5 Avaliação da penetração cutânea *in vitro* das nanopartículas por microscopia de fluorescência

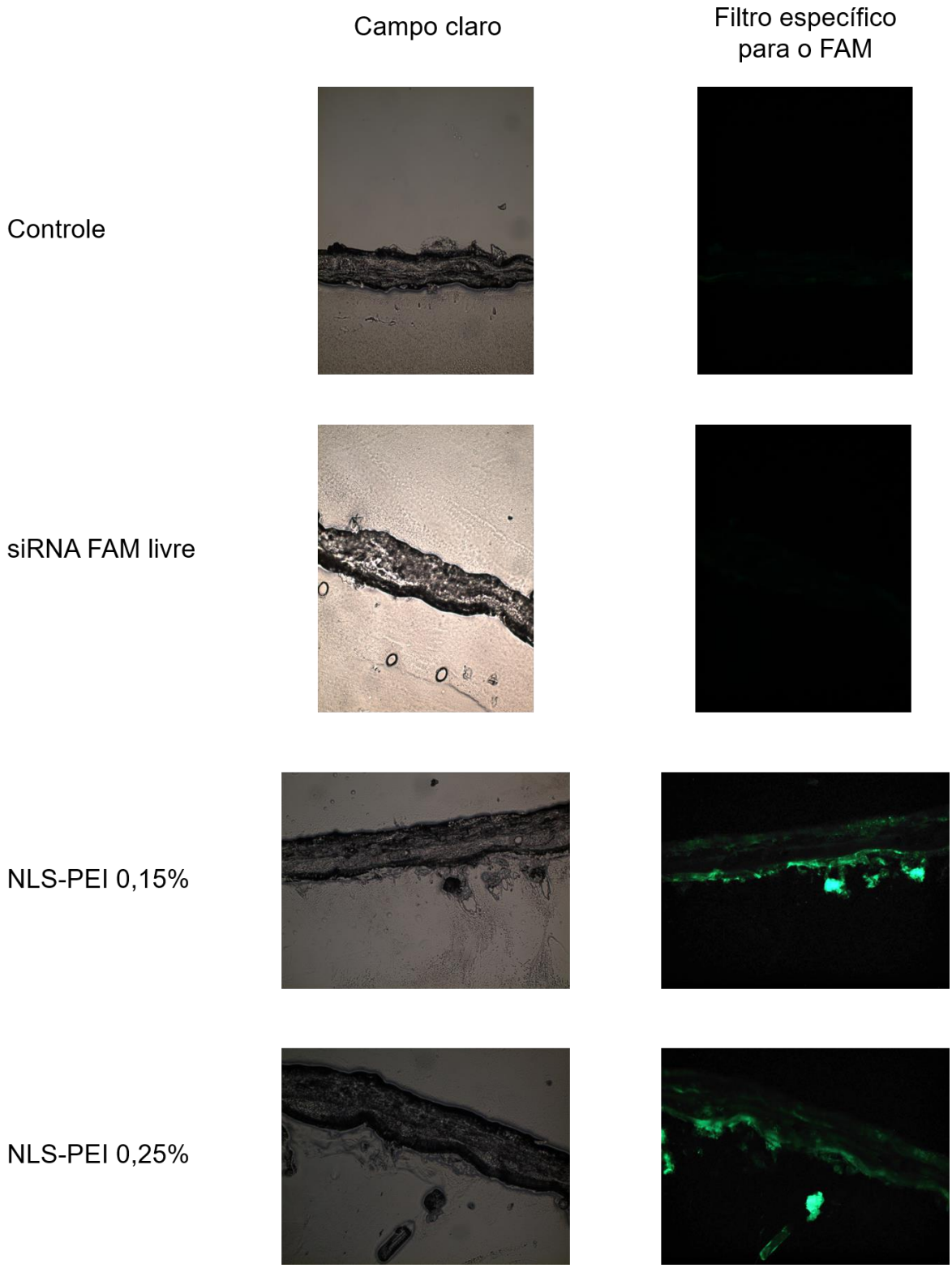
Os siRNAs são moléculas hidrofílicas que devido a suas características físico-químicas, não são capazes de difundir passivamente através do estrato córneo e atingir as demais camadas da pele (BRUNO, 2011). Além disso, a entrega direta do siRNA livre para alguns tecidos tem pouca possibilidade de eficácia se ele não estiver estruturalmente modificado ou acompanhado de um sistema de liberação. O perfil farmacocinético do siRNA livre é ruim, sendo quase instantaneamente degradado pelas RNases do tipo nucleases que conduz a um curto tempo de meia-vida, da ordem de < 30 min (ALIABADI et al., 2012; GUZMAN-VILLANUEVA et al., 2014). Portanto, sua veiculação em sistemas de liberação que possuem a capacidade de atravessar a barreira do estrato córneo é de extrema importância, além de facilitar o *uptake* celular e fornecer proteção ao siRNA contra degradação enzimática. A liberação tópica de siRNA foi relatada usando uma série de sistemas de entrega como lipossomas, nanopartículas poliméricas, conjugado polímero-fármaco, dendrímero, emulsões, nanoemulsões, nanopartículas de sílica mesoporosa e nanopartículas de óxido de ferro (ALDAWSARI et al., 2015).

A penetração das NLS-PEIs foi investigada mediante o uso do siRNA-FAM, durante 24 h de tratamento. Foi utilizado esse fluorófilo devido ao microscópio de fluorescência disponível não possuir filtro para o Alexa fluor®. Os resultados deste estudo estão demostrados na Figura 29.

Devido a autofluorescência da pele, cortes de pele tratada apenas com PBS foram usadas como controle. Na Figura 29 é possível observar a baixa autofluorescência da pele controle. A fluorescência de todas as amostras tratadas foi corrigida em função deste controle para evitar interpretações errôneas.

Quando o siRNA livre foi aplicado sobre a pele, não se observou fluorescência na superfície da pele (Figura 29). Vicentini e colaboradores (2013) encontraram resultados semelhantes quando avaliaram a penetração de nanodispersões de cristais líquidos para liberação de siRNA na pele.

Figura 29 - Fotomicrografias de cortes histológicos sem tratamento (controle), siRNA-FAM livre e tratadas com as NLS-PEIs 0,15% e 0,25% complexadas com siRNA-FAM. Os cortes foram visualizados utilizando um filtro específico para o FAM através de uma objetiva de 10x. Três lotes de cada formulação foram testados, e imagens representativas estão apresentadas.



Quando se inicia o transporte de moléculas através do estrato córneo, o mesmo ocorre essencialmente por difusão passiva pelas vias intercelular e intracelular dependendo da polaridade da molécula, sendo que moléculas lipofílicas permeiam pela via intercelular (lamelas lipídicas) e moléculas hidrofílicas pelas paredes celulares dos corneócitos (domínios proteicos) numa sequência sucessiva de interações. Um fenômeno importante que acontece no transporte pelo estrato córneo é o efeito reservatório para fármacos lipofílicos, pelo facilitado particionamento nesse meio e represamento ao atingir a epiderme viável (JEPPS et al., 2013).

Foi observado um aumento da penetração do siRNA-FAM através do estrato córneo alcançando a epiderme viável, quando complexado aos NLS-PEIs. Além disso, observa-se que o siRNA-FAM não está limitado a certas regiões como em folículos pilosos, propriedade esta descrita para as nanopartículas quando aplicadas na pele (BARRY, 2006). Esse resultado pode ser explicado devido a uma provável penetração das NLS-PEIs carreando o siRNA ou ainda devido a um efeito oclusivo promovido pelas nanopartículas que favorece a penetração (SCHNEIDER et al., 2009). Além disso, foi observada fluorescência apenas na região da epiderme o que demonstra que as nanopartículas liberaram o siRNA-FAM na epiderme, não ultrapassando a derme (Figura 29). Este resultado é relevante pois a penetração das nanopartículas até a derme pode levar a uma absorção sistêmica das mesmas. Assim, em relação a penetração, pode-se inferir que a formulação do presente trabalho apresentou segurança para ser usada como sistema de liberação tópico.

O uso de NLSs como carreadores na área dermatológica e cosmética tem sido amplamente estudado devido as suas características favoráveis baseadas em compostos não irritativos e não tóxicos, biocompatibilidade, baixa resposta imune e baixo custo (GEUSENS et al. 2011; GUZMAN-VILLANUEVA et al. 2012; RADTKE & WISSING 2002; ALDAWSARI et al. 2015). O aumento da penetração na pele de compostos encapsulados em NLSs é amplamente descrito na literatura como, por exemplo, vitamina A (GOHLA et al. 2000), isotretionina (LIU et al. 2007), agente antifungico imidazólico (SOUTO & MU 2006), flurbiprofeno (MAIA et al. 2017) e outros (MUKHERJEE et al 2009). NLS preparadas de forma semelhante utilizando Compritol 888 ATO e polaxamer carreando glicocorticoides foram desenvolvidas por Schlupp e colaboradores (2011). Eles observaram que as NLSs foram capazes de melhorar a penetração tópica de prednisolona e despertaram particular interesse no tratamento de disfunção epidermica.

O uso de NLS modificadas para liberação de siRNA foi relatado anteriormente por alguns autores (SHEGOKAR et al. 2011; JEONG et al. 2011). Já foi descrito um sistema hibrido usando um grupo pirrolidínico cíclico anfifílico conjugado com nanopartículas de PLGA para administração tópica de siRNA anti-TNFα que mostrou atividade biológica semelhante ao inibir inflamação da pele *in vivo*. Os autores concluíram que a nanopartícula pode transportar eficientemente o siTNF-α para a derme mais profundamente no tratamento da inflamação da pele (DESAI et al., 2013). Até o presente momento, nanocarreadores híbridos de lipídio-polietilenimina para liberação tópica de siRNA são relatados aqui pela primeira vez. Nossos resultados demonstraram que ambos NLS-PEIs com 0,15 e 0,25% promoveram a penetração de siRNA pelo estrato córneo seguindo uma deposição de siRNA na epiderme, sendo, portanto, favorável para aplicação e silenciamento gênico *in vivo*. No entanto, conforme demonstrado no estudo de eficiência de silenciamento *in vitro* (4.2.4) a NLS-PEI 0,25% foi a que apresentou maior atividade, sendo, portanto, apenas essa formulação utilizada nos ensaios *in vivo.* Esta escolha foi realizada com o intuito de se reduzir o número de animais utilizados nos testes seguintes e estando de acordo com o principio dos 3'R (redução, substituição e refinamento) no uso de animais (RUSSELL & BURCH, 1959)

4.3 ESTUDOS *IN VIVO*

A utilização de modelo *in vitro* de pele suína e modelo *in vivo* em camundongos diferem em aspectos estruturais e morfológicos da pele como espessura e organização do estrato córneo, composição lipídica intercelular e número de apêndices cutâneos. No entanto, contemplam os estudos para penetração celular cutânea *in vitro* e avaliação *in vivo* de forma satisfatória, pois a pele suína possui propriedades bioquímicas e histológicas semelhantes a pele humana e o uso de camundongos *hairless* se torna facilitado pelo seu pequeno porte, disponibilidade e a ausência de pêlos que mimetiza a cobertura pilosa da pele humana (DEPIERI et al., 2015; GODIN, TOUITOU, 2007).

4.3.1 Avaliação da eficácia do siTNF-α veiculado pela NLS-PEIs por meio da quantificação dos níveis de interleucina TNF-α por ELISA e do RNAm TNF-α por qRT-PCR

A eficácia *in vivo* da NLS-PEI foi avaliada pela determinação do efeito do siTNF-α complexado com este sistema contra o aumento dos níveis cutâneos de TNF-α em modelo de inflamação cutânea aguda e crônica induzida pelo TPA (MURAKAWA et al., 2006; KALAIARASU et al., 2016). Kumar e colaboradores (2011) mostraram que a exposição ao TPA resulta em aumento da secreção de TNF-α, sugerindo que essa citocina ativa a sinalização inflamatória e desempenhe papel fundamental na dermatite de contato induzida por TPA. A indução de TNF-α na pele pela aplicação tópica com TPA é em parte, derivada de queratinócitos (MURAKAWA et al., 2006).

O TPA e outros esteres de forbol são relatados como potentes ativadores da cascata inflamatória na pele e é um agente inflamatório bem conhecido, amplamente utilizado para induzir respostas inflamatórias agudas e crônicas em modelo *in vivo* (CORUZZI et al., 2012; LEE et al., 2012; KALAIARASU et al., 2016).

O TNF-α (Fator de necrose tumoral), citocina pleiotrópica moduladora da resposta imune secretada por macrófagos ativados, monócitos, linfócitos, células NK, neutrófilos e mastócitos (WALTERSCHEID et al., 2002), foi detectado e quantificado por ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay). O RNAm (RNA mensageiro) que codifica a produção dessa citocina foi quantificado por PCR (Polimerase Chain Reaction) que emite resultados qualitativos e quantitativos mediante a detecção da presença de seqüências específicas do RNAm em estudo.

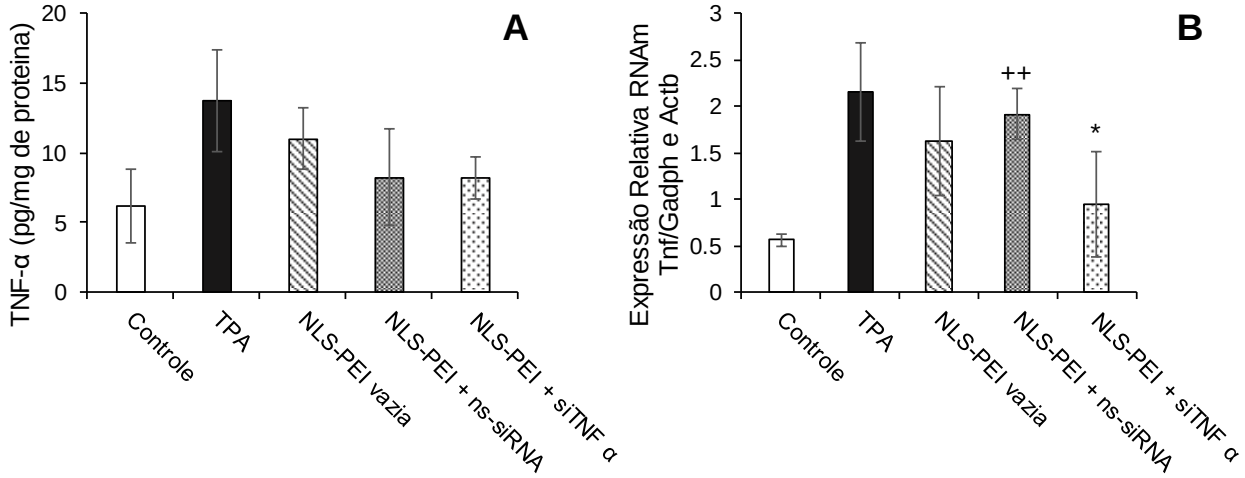
Inflamação aguda

Na Figura 30 estão apresentados os resultados obtidos para ensaios biológicos de Elisa e PCR no modelo de inflamação aguda.

Os resultados apresentados na Figura 30 demonstram que a aplicação de TPA induziu um aumento nos níveis da citocina TNF-α (Figura 30–A) e do RNAm que codifica essa citocina pró-inflamatória na pele dos camundongos (Figura 30–B), corroborando com outros trabalhos descritos na literatura (MURAKAWA et al, 2006; KUMAR et al, 2011). Murakawa e colaboradores (2006) demonstraram que em peles tratadas com o TPA, a citocina TNF-α localiza-se principalmente em torno dos queratinócitos epidérmicos, enquanto que no controle negativo (peles tratadas com acetona, no caso) a

proteína TNF-α foi detectada em pequenas quantidades, corroborando com os resultados do presente estudo.

Figura 30 - Avaliação *in vivo* da citocina inflamatória TNF-α após tratamento com a NLS-PEI complexada com o siTNF-α por ELISA (A) e avaliação do efeito das NLS-PEI complexada com o siTNF-α na normalização do aumento dos níveis do RNAm TNF-α por PCR (B), em modelo de inflamação aguda induzida pelo TPA. Os resultados (n=4) estão apresentados como média ± desvio padrão, avaliados pelo teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Turkey, sendo *p<0,05 em relação ao TPA (controle positivo) e ++<0,01 em relação ao controle negativo.



Os pré-tratamentos com as NLS-PEIs vazia, com NLS-PEI + siRNA não especifico (ns-siRNA) e com NLS-PEI + siTNF-α foram capazes de reduzir levemente a quantidade da citocina estudada, provavelmente devido a uma interferência da formulação na ação do TPA, ou ainda devido a um efeito hidratante que as NLS-PEIs ocasionam na pele do animal protegendo-a da ação irritante do TPA. Essa leve redução pode estar relacionada com o curto tempo do estudo que não foi suficiente para que houvesse o silenciamento na produção dessa proteína. Esta inferencia foi corroborada com a análise de PCR onde verifica-se que há diferença significante (p<0,05) nos níveis de indução da produção dessa citocina entre os grupos TPA e NLS-PEI + siTNF-α. Os níveis da citocina TNF-α aumentam 1,5 h após a lesão cutânea, atingindo pico máximo 4h depois. Após 24h os níveis da citocina retornam ao estado basal (MURAKAWA et al., 2006).

Desse modo, o tratamento tópico com as NLS-PEI + siTNF-α promoveu diminuição da inflamação local, por meio da redução dos níveis de RNAm TNF-α em aproximadamente 56,4%. Por consequência, acredita-se que com um tempo de tratamento maior que o estudado neste trabalho, a liberação exacerbada da citocina TNF-α poderia ser diminuída e consequentemente inibido o desenvolvimento agudo das etapas do processo inflamatório. Pode-se afirmar que o efeito terapêutico observado no presente estudo, foi decorrente das características intrínsecas das NLS-PEIs, as quais contam com propriedades já descritas como composição química, tamanho nanométrico e carga positiva. Assim, as nanopartículas promoveram proteção e eficiente entrega celular do siRNA com consequente silenciamento da citocina pró-inflamatória em estudo.

Os níveis de RNAm TNF-α quantificados após os tratamentos com NLS-PEI vazia e com NLS-PEI + ns-siRNA são maiores que o grupo controle negativo (animais que não sofreram a ação do TPA), indicando a viabilidade do modelo *in vivo* de inflamação aguda para avaliação da eficácia da NLS-PEI como sistema carreador para siRNAs. Também pode-se observar que não houve diferença significativa nos níveis de RNAm TNF-α entre os grupos de animais com inflamação induzida por TPA (controle positivo) e grupos de animais com inflamação induzida por TPA e tratados com as NLS-PEI vazia e NLS-PEI + ns-siRNA. Este resultado mostra a ausência de silenciamento não específico e garante a especificidade do processo de RNAi mediado por siRNA, onde a normalização dos níveis do RNAm TNF-α ocorre somente quando do uso de um siRNA específico contra a sequência do RNAm que codifica a citocina.

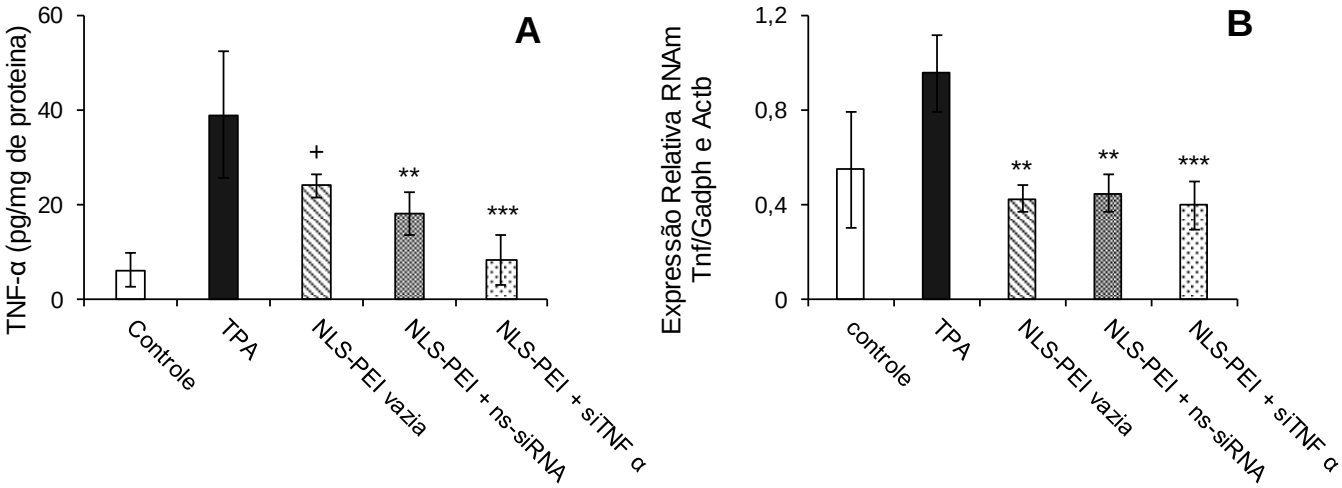
Inflamação crônica

Como uma segunda medida da atividade antiinflamatória *in vivo* das NLS-PEI + siTNF-α, os grupos foram administrados em um modelo de inflamação crônica da pele induzido por exposição repetida ao éster de forbol (ALFORD et al., 1992). Na Figura 31 estão apresentados os resultados obtidos para os ensaios biológicos de Elisa e PCR no modelo de inflamação crônica.

Semelhante ao tratamento da inflamação aguda, na indução da inflamação crônica (Figura 31) é possível inferir que o tratamento com TPA induziu um aumento estatisticamente significativo nos níveis de RNAm e consequentemente nos níveis da citocina pró-inflamatória TNF-α, na pele dos camundongos. Esse resultado também foi observado por Kalaiarasu e colaboradores (2016). No entanto, os pré-tratamentos com as NLS-PEIs vazia, com NLS-PEI + ns-siRNA e com NLS-PEI + siTNF-α foram capazes de reduzir a indução da produção do RNAm TNF (Figura 31-B) e consequentemente a

produção dessa citocina (Figura 31-A). Estes resultados indicam que o tratamento com as NLS-PEIs não são passiveis de promover inflamação ou irritação cutânea, condição importante para produtos de aplicação tópica (PAUDEL et al., 2010).

Figura 31 - Avaliação *in vivo* da citocina inflamatória TNF-α após tratamento com a NLS-PEI complexada com o siTNF-α por ELISA (A) e avaliação do efeito das NLS-PEI complexada com o siTNF-α na normalização do aumento dos níveis do RNAm TNF por PCR (B), em modelo de inflamação crônica induzida pelo TPA. Os resultados (n=4) estão apresentados como média ± desvio padrão, avaliados pelo teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Turkey, sendo **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao TPA (controle positivo) e ++p<0,01 em relação ao controle negativo.



Como anteriormente observado com o modelo de inflamação aguda, o modelo *in vivo* de inflamação crônica para avaliação da eficácia da NLS-PEI como sistema carreador para siRNAs foi considerado eficiente uma vez que, os níveis de TNF-α quantificados após os tratamentos com NLS-PEI vazia e com NLS PEI + ns-siRNA foram significativamente maiores que o grupo controle negativo.

O tratamento com a NLS-PEI contendo siRNA TNF-α foi capaz de reduzir significativamente os níveis de RNAm TNF-α e consequentemente de TNF-α em comparação à pele dos animais com processo inflamatório induzido e sem tratamento (controle positivo) em 58,25% e 78,44%, respectivamente.

Estes resultados realçam a importância da nanopartícula desenvolvida para uma entrega eficaz de moléculas de siRNA na pele que, em seguida, são internalizadas pelas

células epidérmicas e, no citoplasma, desencadeiam o processo de silenciamento por RNAi.

Os resultados *in vivo* aqui apresentados estão de acordo com os resultados obtidos de captação celular e de penetração *in vitro.* Deve-se ressaltar que o siRNA foi capaz de exercer seu efeito, mesmo na presença de grandes obstáculos ao tratamento, como a barreira do estrato córneo e a presença de diferentes enzimas, que podem inativar a molécula após a penetração. Esta alta eficácia foi atingida devido ao sistema de liberação desenvolvido que foi eficiente em proteger o siRNA, aumentar a sua penetração e sua captação celular.

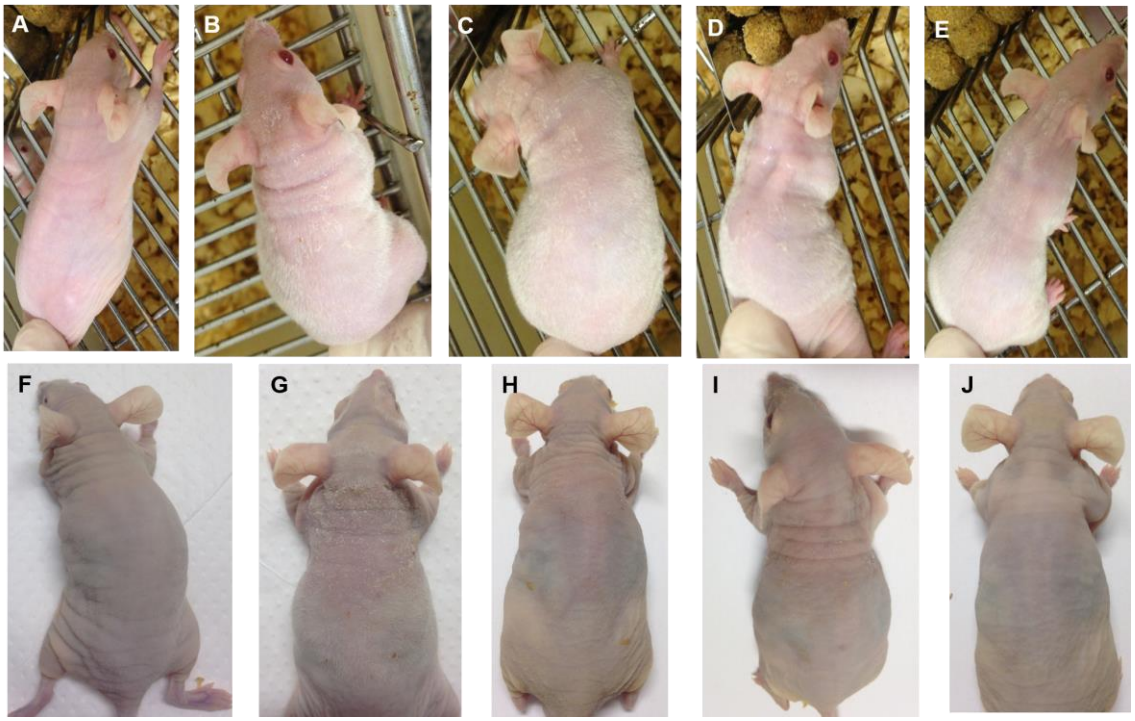
Considerando que níveis elevados de TNF-α tem um papel importante nas doenças inflamatórias, espera-se que o silenciamento da expressão do TNF-α reduza a inflamação com efeitos colaterais mínimos. Assim, estudos histológicos mais aprofundados foram realizados como descrito abaixo.

4.3.2 Análises histológicas

A análise histológica das peles dos animais tratados foi realizada com o intuito de se identificar alterações morfológicas e suas consequências macroscópicas nos tecidos. Na Figura 32 são mostradas as fotografias do dorso dos camundongos capturadas ao final do tratamento no modelo de inflamação cutânea aguda e crônica.

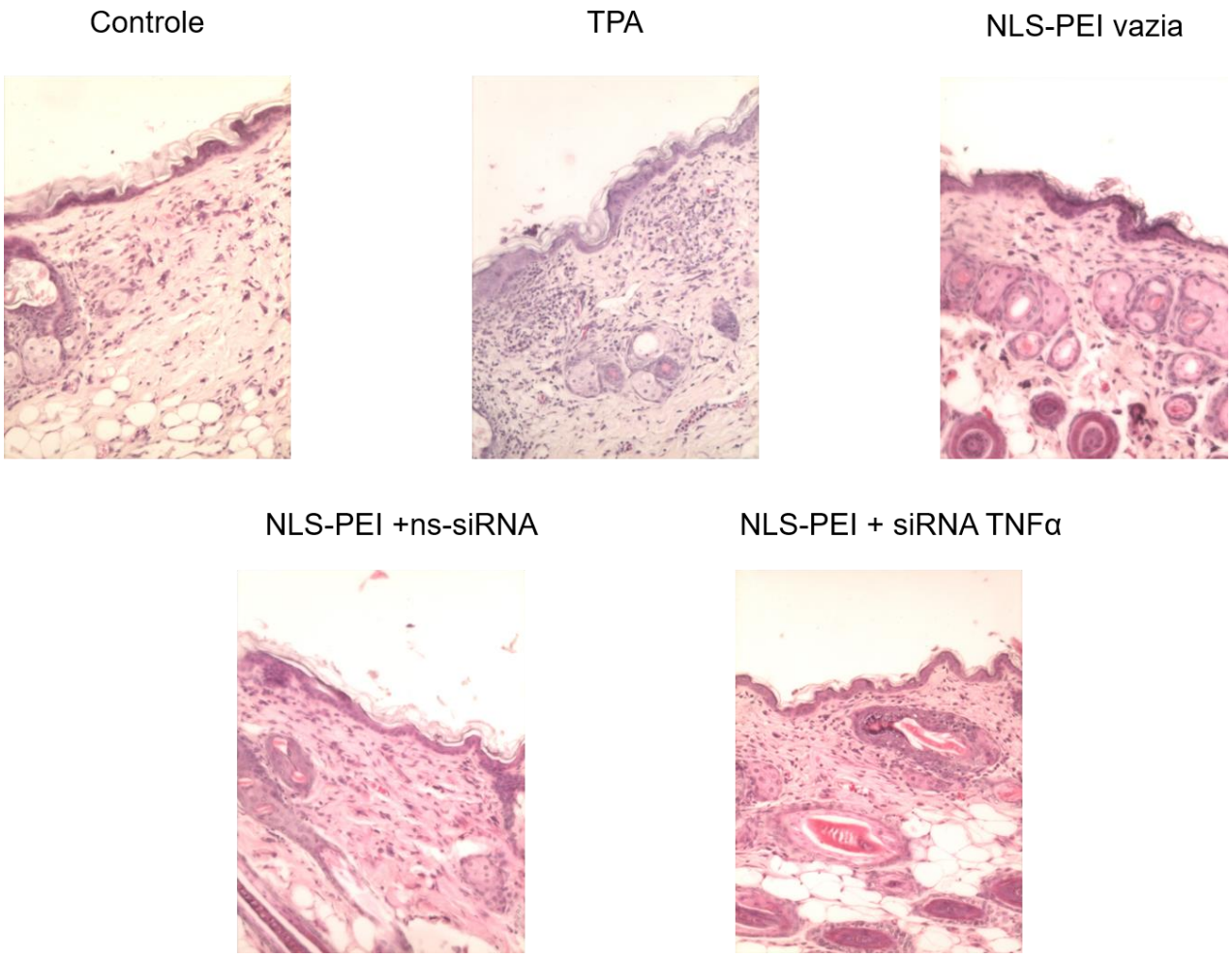
A Figura 32-B e G correspondem ao fenótipo característico de inflamação local aguda e crônica, respectivamente, após indução com TPA. Nestas figuras observa-se o característico aumento da permeabilidade vascular, edema, inchaço na derme e proliferação de queratinócitos, corroborando com outros trabalhos descritos na literatura (ZHANG et al., 2016; KUMAR et al., 2011). Também se observa uma nítida melhora nesse fenótipo após o tratamento com as NLS-PEIs, sobretudo com as NLS-PEIs veiculando siRNA TNF-α (Figura 32-E e J), apresentando redução na descamação, edema e rubor da pele dos animais em comparação aos grupos tratados somente com TPA. Dessa forma, pode-se inferir que a redução dos níveis do RNAm TNF-α, resultado da ação do siRNA TNF-α veiculado pela NLS-PEI, foi substancial para a melhora fenotípica observada no dorso dos animais.

Figura 32 - Imagens representativas da pele de camundongos *hairless* com inflamação cutânea aguda tratados com: A) Acetona (controle negativo); B) TPA (controle positivo); C) NLS-PEI vazia + TPA; D) NLS-PEI + ns-siRNA + TPA; E) NLS-PEI + siRNA TNF-α + TPA. E pele de camundongos *hairless* com inflamação cutânea crônica tratados com: F) Acetona (controle negativo); G) TPA (controle positivo); H) NLS-PEI vazia + TPA; I) NLS-PEI + ns-siRNA + TPA; J) NLS-PEI + siRNA TNF-α + TPA



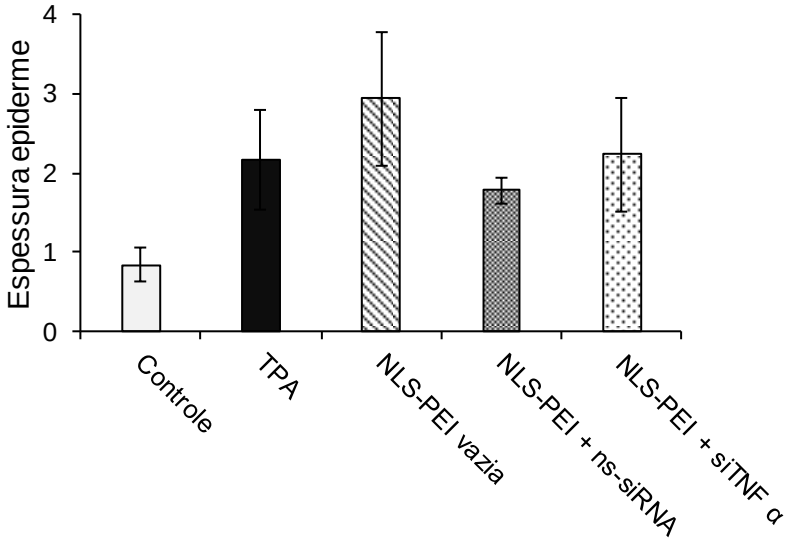
Em seguida, cortes histológicos das peles dos animais corados por H&E foram investigadas. A coloração por H&E foi feita com o intuito de se visualizar as estruturas da pele, analisar a espessura da epiderme e a infiltração de células inflamatórias na derme. A análise dos cortes histológicos corrobora com o fenótipo dos animais, como pode-se observar na Figura 33 e Figura 35.

Figura 33 - Fotomicrografias representativas da pele dorsal de camundongos hairless, inflamação cutânea aguda. Os cortes foram visualizados por microscopia de luz convencional utilizando objetiva de 20X.



Analisando a Figura 33 é possível verificar que os animais que receberam acetona não apresentaram alterações na derme e nem na epiderme e que a aplicação de TPA resultou em acentuada infiltração de células inflamatórias na derme após 6 h de contato com TPA. Estes resultados também foram anteriormente relatados por Murakawa e colaboradores (2006). Nas peles tratadas com as NLS-PEIs verifica-se uma quantidade inferior de infiltrado celular o que pode indicar controle da inflamação. No entanto, não houve diferença estatística significante entre as espessuras da epiderme para cada tratamento em relação ao controle da inflamação (TPA) (Figura 34).

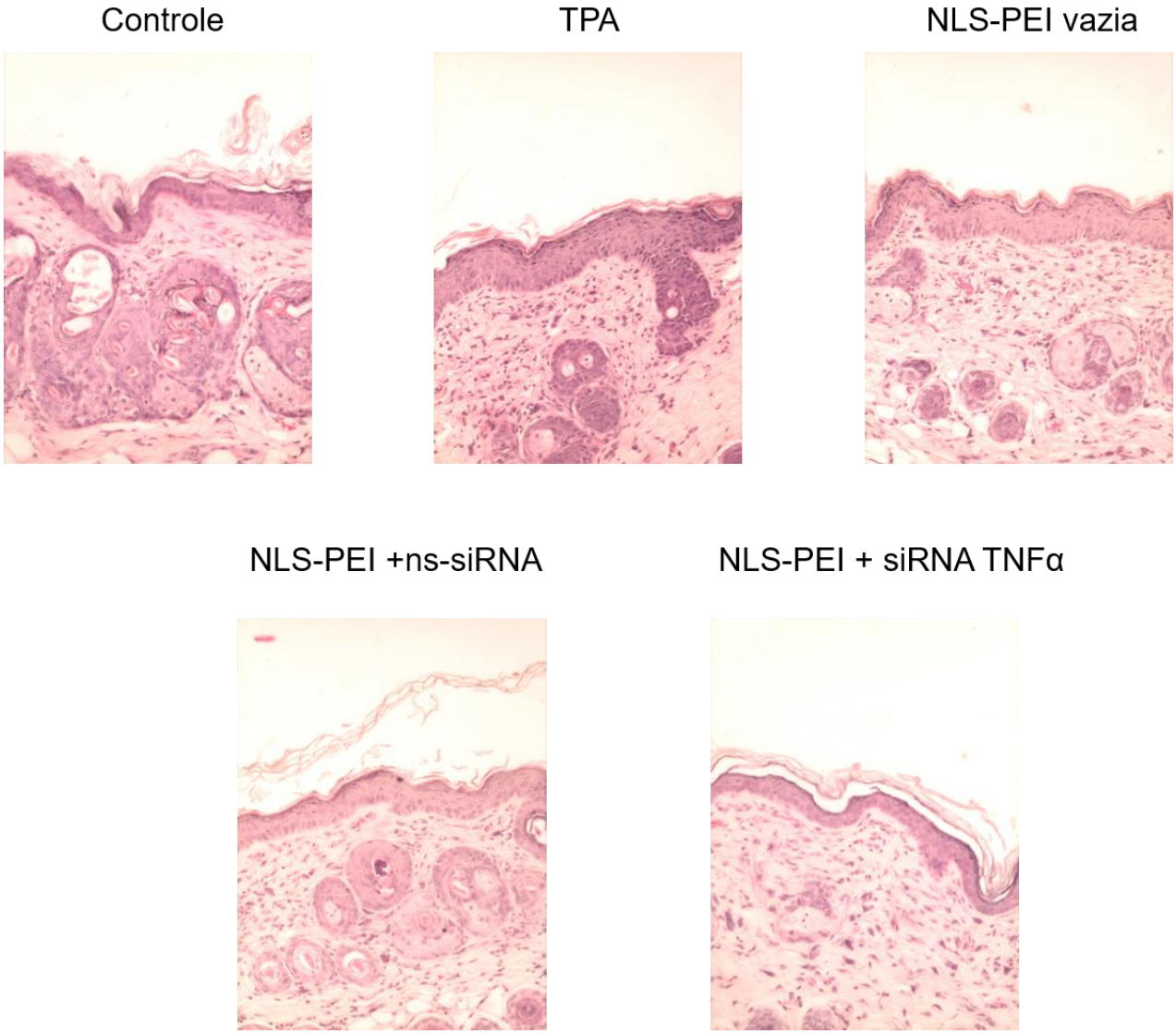
Figura 34 - Espessura da epiderme dorsal de camundongos. Inflamação cutânea aguda. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n=4). Analise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós teste de Turkey em relação ao controle positivo (TPA) e ao controle negativo (acetona).



As fotomicrografias dos cortes histológicos no modelo de inflamação crônica corados por H&E estão demostradas na (Figura 35).

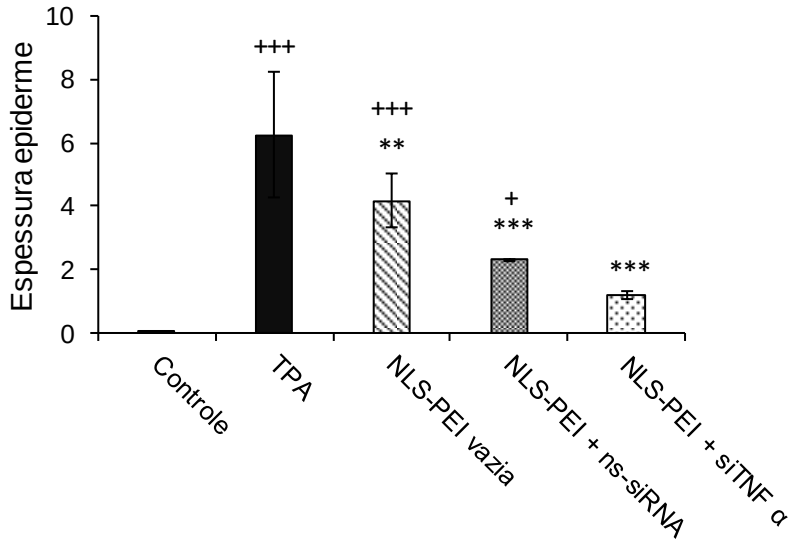
Para os tratamentos na inflação crônica (Figura 35) observa-se que os animais que receberam acetona não apresentaram alterações na derme e nem na epiderme. A indução da inflamação com TPA foi capaz de desenvolver características típicas da inflamação local como aumento acentuado da espessura da epiderme, com clara evidência de edema e infiltração intensa de células inflamatórias na derme, com acúmulo particular nas regiões polissebáceas. Embora na inspeção visual os camundongos parecessem sem pêlo (*hairless*), cortes histológicos revelaram a presença de folículos pilosos primitivos na derme. Esse edema acentuado pode estar relacionado com a capacidade do TNF-α aumentar a permeabilidade vascular, corroborando assim com os resultados encontrados na dosagem dessa citocina (Figura 31) onde observou-se níveis acentuados dessa citocina no grupo tratado com TPA.

Figura 35 - Fotomicrografias representativas da pele dorsal de camundongos hairless, inflamação cutânea crônica. Os cortes foram visualizados por microscopia de luz convencional utilizando objetiva de 20X.



Ocorreu um aumento significativo da espessura da epiderme (Figura 36) dos animais tratados com TPA em relação aos grupos dos animais tratados com acetona. Esse aumento é resultado da proliferação elevada de queratinócitos com diferenciação anormal, devido à ação de várias citocinas e é concordante com outros trabalhos que utilizaram o modelo de inflamação crônica induzida por TPA (MURAKAWA et al., 2006).

Figura 36 - Espessura da epiderme da pele dorsal de camundongos. Inflamação cutânea crônica. Os resultados representam a média ± desvio padrão (n=4 animais por grupo). Analise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós teste de Turkey, +p <0,05 e +++p<0,001 em relação ao controle negativo (acetona) e **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle positivo (TPA)



Entretanto, o tratamento com as NLS-PEI veiculando siRNA TNF-α reduziu significativamente a espessura da epiderme dos animais em 71,16% e 47,65% comparado aos grupos tratados com a NLS-PEIs vazia e as NLS-PEIs + ns-siRNA, respectivamente. Não houve diferença significativa na espessura da epiderme entre os grupos tratados com as NLS-PEIs vazia e as NLS-PEIs + ns-siRNA. A redução da espessura da epiderme ocasionou a melhora fenotípica da pele dos animais. Assim, a NLS-PEI + siRNA TNF-α pode atuar reduzindo os níveis de infiltrados celulares ativados durante o processo inflamatório e na secreção de citocinas, reduzindo assim a inflamação cutânea.

A análise histológica da pele do dorso dos camundongos confirma claramente que a NLS-PEI carreando siTNF-α foi efetiva, inibindo de forma geral o influxo de leucócitos polimorfonucleares. Propõe-se que a redução da espessura da epiderme, redução da ativação e migração de leucócitos em resposta ao TPA está relacionada à capacidade da NLS-PEI + siTNF-α em inibir a liberação dessa citocina pró-inflamatória. Este conceito correlaciona-se bem com achados na literatura que descrevem que células da pele lesada, como células dendríticas dérmicas, células de Langerhans epidérmicas,

melanócitos, fibroblastos e leucócitos, são conhecidas como fontes e alvos de citocinas (KUMAR et al., 2011).

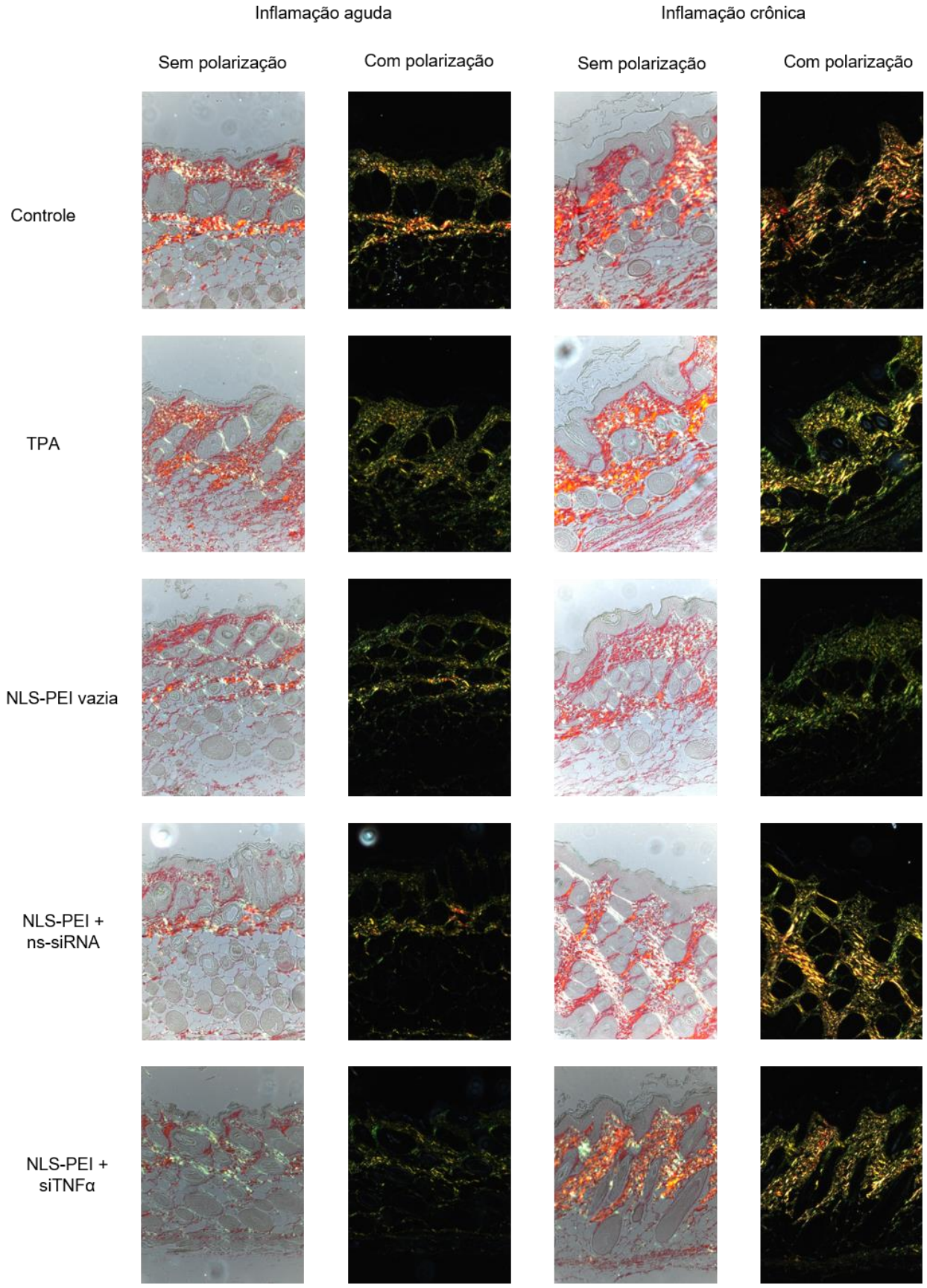
Esse achado é importante pois uma formulação tópica deve ser avaliada não só pela penetração na pele e capacidade de liberar o fármaco nas células, mas também em termos de tolerabilidade e toxicidade cutânea (PAUDEL et al., 2010)

A matriz extracelular (MEC) é principalmente composta por duas classes de macromoléculas: proteínas fibrosas (incluindo colágenos e elastina) e glicoproteínas (incluindo fibronectina, proteoglicanos e laminina). Na derme, o colágeno é um componente importante e desempenha um papel-chave na resistência e elasticidade da pele. As fibras colágenas representam 90% de todas as fibras dérmicas e 80% da matriz extracelular dérmica. Os colágenos tipos I, III e V são os que predominam na derme, sendo responsáveis por aproximadamente 87%, 10% e 3%, respectivamente, do colágeno dérmico. A MEC está em constante remodelação e sua síntese e degradação acompanha a morfogênese, a regeneração, a cura de feridas e os processos fibróticos crônicos (BEDOYA *et al.,* 2016). Desta forma, a avaliação dos colágenos nos modelos de inflamação aguda e crônica antes e após os tratamentos é relavante.

A coloração por *Picrosírius Red* foi feita para se identificar os tipos de colágenos presente nas lâminas com os cortes de pele dos camundongos. *Picrosirius* é uma coloração seletiva de tecido conjuntivo que permite uma análise qualitativa das fibras colágenas. Quando observada sob luz polarizada, pela diferença na interferência de cores, na intensidade e na birrefringência dos tecidos corados, essa coloração permite a diferenciação principalmente das fibras tipo I e tipo III (JUNQUEIRA et al., 1979) (Figura 37).

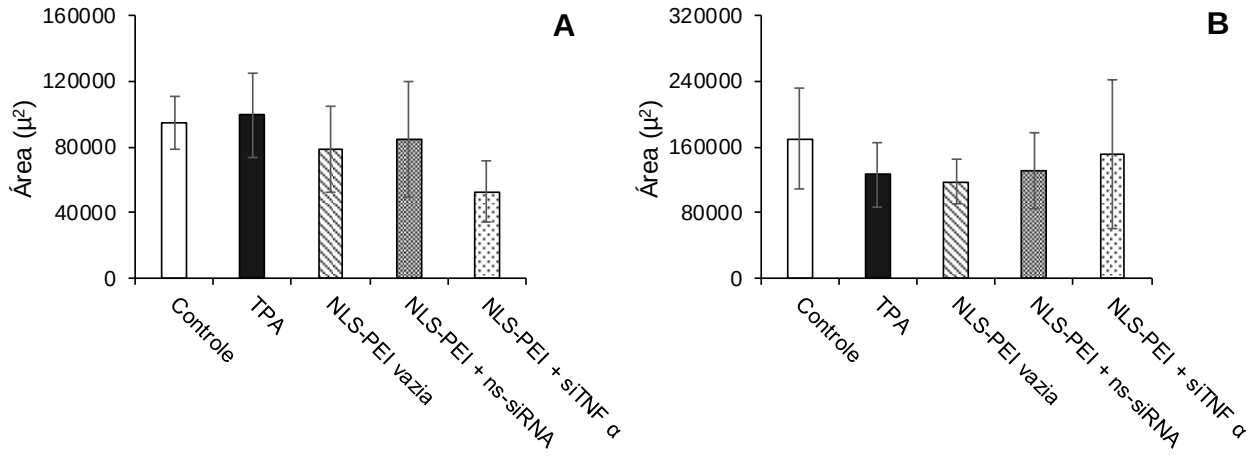
A análise das imagens, tanto para a inflamação aguda quanto para a crônica, permite verificar que para o grupo controle negativo há predominância da cor vermelho-alaranjada, o que corresponde à presença do colágeno tipo I, maduro. Para os demais grupos há uma predominância coloração amarelo-esverdeada que sugerem presença de colágeno recente, em especial tipo III, o que indica possível regeneração do tecido uma vez que as fibras de colágeno III são as primeiras a serem formadas durante o processo cicatricial, sendo posteriormente substituídas por fibras de colágeno tipo I (RIBEIRO et al., 2015).

Figura 37 - Cortes histológicos corados pelo método Picrosirius red (20x), sem e com polarização. Evidencia-se em vermelho alaranjado o colágeno tipo I e, em amarelo esverdeado, o colágeno tipo III.



Utilizando as imagens obtidas por essa coloração, fez-se uma análise histométrica das áreas de colágeno total. O resultado desta análise está apresentado na Figura 38.

Figura 38 - Médias e desvio padrão dos valores das áreas ocupadas pelo colágeno total, sendo (A) inflamação cutânea aguda e (B) inflamação cutânea crônica. Não foi observada diferença estatistica entre os grupos.



Não houveram diferenças estatísticas significantes na quantidade de colágeno total dos tecidos analisados, o que permite inferir que os tratamentos desenvolvidos neste trabalho não promoveram danos cutâneos relacionados a resistência e elasticidade da pele.

4.3.3 Avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLS-PEI por microscopia confocal de varredura a laser.

O estudo de penetração de fármacos após a aplicação de produtos tópicos geralmente é avaliado com o uso de pele normal ou intacta. No entanto, os produtos tópicos muitas vezes são aplicados na pele doente sendo bem conhecido que a pele pode ser funcionalmente e estruturalmente alterada por inflamações cutâneas (LIN et al, 2015).

Dessa forma, foi proposta a avaliação da penetração cutânea do siRNA veiculado pela NLS-PEI na pele sadia (Figura 39) e inflamada induzida pela aplicação do TPA (Figura 40). Em consequência da autofluorescência da pele, devido à presença de compostos endógenos como as proteínas estruturais melanina, queratina, colágeno,

dentre outros, que emitem fluorescência num comprimento de onda na faixa de 400 – 500 nm (DEPIERI et al, 2015), foi utilizado um siRNA controle marcado com Alexa-647, que apresenta um espectro de excitação/emissão diferente, com a finalidade de evitar possíveis interferências da autofluorescência da pele.

Baseado nos resultados obtidos nos estudos *in vitro* de captação celular e de penetração em pele de porco, não se utilizou siRNA livre como controle, pois como discutido anteriormente este foi rapidamente degradado.

Nos estudos de penetração em pele sadia, foi observado a penetração do siRNA veiculado pelas NLS-PEI através do EC atingindo a epiderme viável (Figura 39). As nanoparticulas têm sido extensivamente estudadas pelo seu potencial como formulações tópicas em tratar doenças de pele, protegendo o siRNA de possíveis degradações e eficiente entrega na célula alvo (DEPIERI et al., 2016). Para alcançar o objetivo desejável de liberação tópica do siRNA, a barreira do EC deve ser superada e o siRNA deve ser absorvido por fibroblastos quando atingem a derme. Os resultados aqui apresentados mostram que a NLS-PEI favorece a penetração do siRNA no tecido cutâneo. Devido à presença da porção lipídica, sugere-se que elas podem melhorar a penetração por meio da formação de uma camada fina e oclusiva na superfície da pele que impede e/ou dificulta a perda de água transepidermal e consequentemente aumenta a hidratação da pele, favoracendo a penetração de fármacos através do EC e facilitando o acesso a epiderme viável (PETRILLI et al., 2016).

Na Figura 40 pode-se observar que a aplicação de TPA associado ao tratamento com a NLS-PEI foi capaz de promover proteção e penetração cutânea do siRNA no modelo *in vivo* de inflamação aguda e essas moléculas alcançaram as camadas mais profundas da pele. O comprometimento da função barreira da pele é descrito para inflamações induzidas pelo TPA (KUMAR et al., 2011). A deterioração da barreira exercida pelo EC favoreceu a entrega do siRNA para a pele, por outro lado, o aumento da espessura da epiderme, devido à queratinização anormal, que cria um caminho mais longo através do qual os fármacos têm de se difundir, não influenciou na penetração do siRNA, e este foi observado em toda a epiderme viável atingindo também as camadas da derme.

Portanto, a utilização de NLS-PEI veiculando siRNA apresentaram-se como alternativa interessante e eficiente para o tratamento tópico de doenças cutâneas.

Figura 39 - Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes de pele sadias. Grupo controle tratado com PBS e grupo tratado com as NLS-PEI veiculando siRNA Alexa 647. Os cortes foram corados com DAPI para visualização do núcleo (azul). Objetiva de 63X.

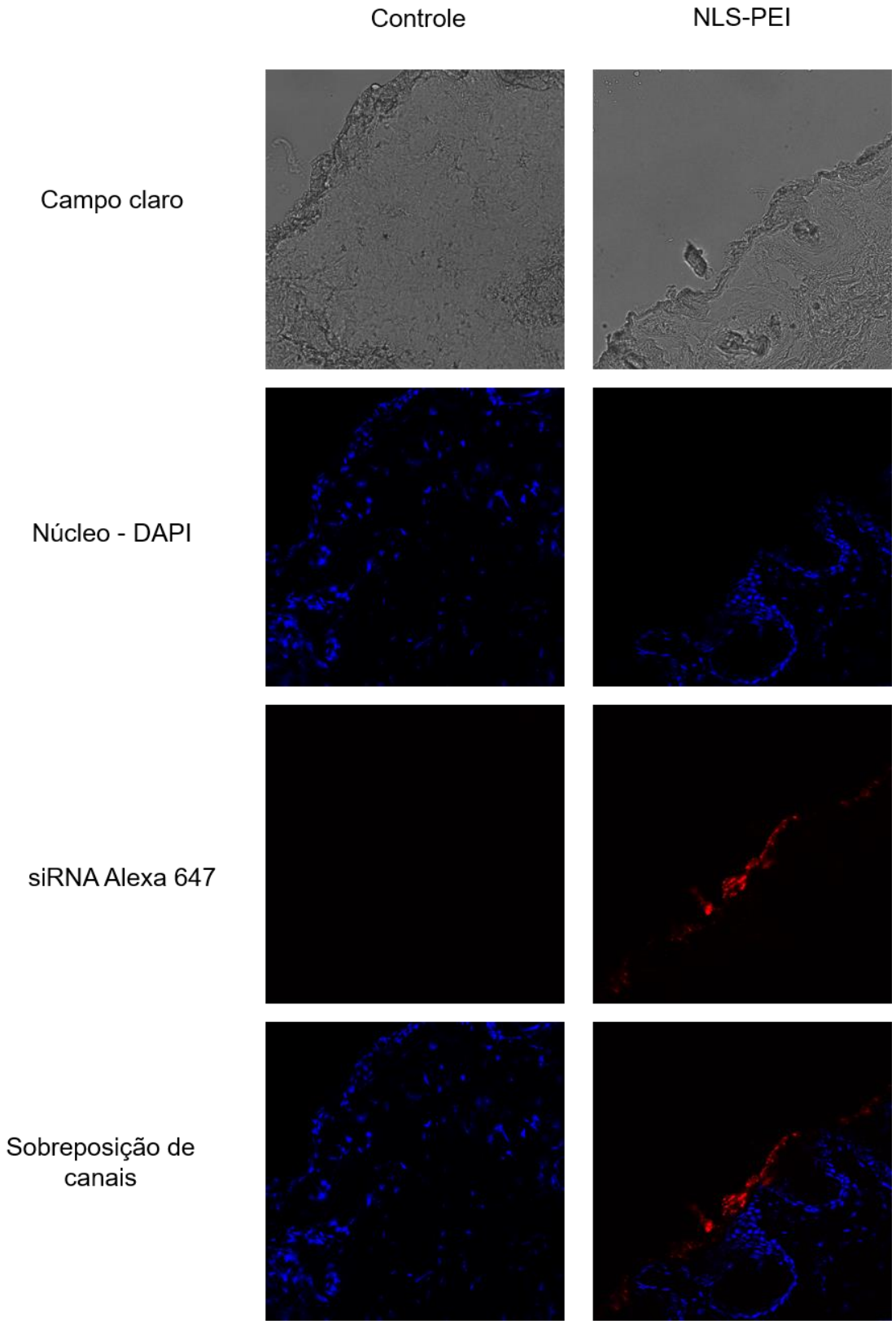
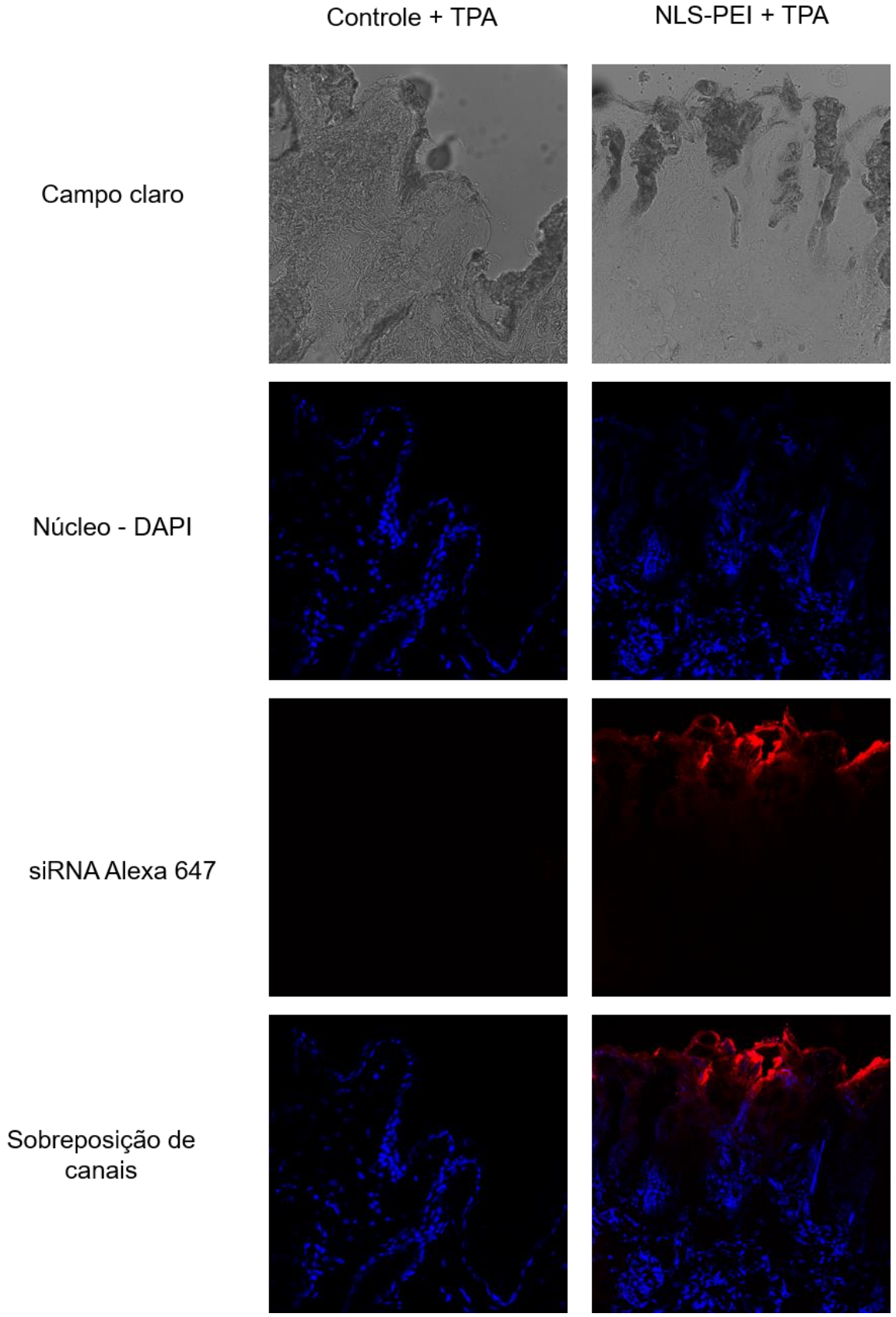


Figura 40 - Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de cortes de pele tratadas com TPA. Grupo controle tratado com PBS e grupo tratado com as NLS-PEI veiculando siRNA Alexa 647. Os cortes foram corados com DAPI para visualização do núcleo celular (azul). Objetiva de 63X.



5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos permite-se concluir:

- A otimização da produção das NLS-PEI foi uma ferramenta interessante para a avaliação da influência de fatores no processo de produção das nanopartículas e da sua composição nas propriedades físicas das mesmas, permitindo a escolha de carreadores estáveis e com composição interessante para a veiculação do siRNA;
- As nanopartículas preparadas nesse estudo, compostas por Compritol® 888 ATO (2,0%), Poloxamer 188 (1,5%) e PEI (0,15 e 0,25%), foram preparadas pelo método de emulsão à quente e ultra-turrrax/sonicação. As NLS-PEI apresentaram-se esféricas com superfície lisa e um tamanho médio de 165 nm, baixo índice de polidispersão (<0,3), potencial zeta positivo e apresentaram estabilidade físicos-quimica no período avaliado (90 dias). O polímero catiônico, PEI, interage com todos os componentes da nanopartícula, o que a caracteriza como nanopartícula híbrida polimérico-lipídica de matriz monolítica;
- As NLS-PEIs foram capazes de complexar o siRNA na concentração final de 10 µM, protegendo-o da degradação como mostrado no ensaio usando 25% de SBF e liberá-lo de forma intacta, etapas essas importantes no processo de RNAi e que foram alcançadas pelas NLS-PEIs;
- A padronização da avaliação *in vitro* para as NLS-PEIs em queratinócitos e fibroblastos possibilitou a obtenção dos parâmetros de tratamento relacionados à densidade celular, ao tempo de tratamento e à diluição da formulação para serem aplicados nas células, evidenciando que a citotoxicidade é proporcional ao volume de NLS-PEI administrado às células;
- As NLS-PEIs foram eficazes em promover uma elevada captação das moléculas de siRNA em linhagem celular de queratinócitos e fibroblastos e a quantidade de siRNA internalizado foi dependente da linhagem celular;
- O siRNA liberado da NLS-PEI foi capaz de promover silenciamento da expressão genica de firefly luciferase (gene exógeno modelo) nas células HaCaT;
- Em ensaios de penetração cutânea *in vitro,* foi evidenciado o aumento da penetração cutânea do siRNA complexado com as NLS-PEI;
- A avaliação *in vivo* em modelo de inflamação cutânea aguda e crônica induzida por TPA, com camundongos *hairless*, demonstrou a eficácia do tratamento com a NLS-PEI contendo siTNF-α pela redução dos níveis da citocina TNF-α e do RNAm

correspondente em comparação com a pele dos animais expostos ao pré-tratamento com a NLS-PEI vazia ou com a NLS-PEI contendo ns-siRNA e TPA nas mesmas doses. Também foi eficaz na melhora fenotípica dos animais, com redução de rubor, descamação, acantose e redução da espessura da epiderme (ensaio crônico). Na dosagem de colágeno total, os tratamentos desenvolvidos não promoveram danos cutâneos relacionados a resistência e elasticidade da pele;

- A aplicação tópica da NLS-PEI *in vivo* foi eficaz em promover a penetração das moléculas de siRNA nas camadas mais profundas na pele inflamada e na epiderme na pele integra.

Diante disso, conclui-se que foi desenvolvido e caracterizado nanopartículas hibridas polimérico-lipídicas de matriz monolítica. Estas partículas demostraram ser sistemas carreadores de siRNA promissores para a administração tópica de siRNA para tratamento de doenças cutâneas, uma vez que foi capaz de superar as barreiras de administração tópica, bem como complexar, proteger contra a degradação enzimática e promover a captação celular das moléculas de siRNA e liberar essas moléculas intactas que, eficientemente, silenciaram seu alvo especifico por meio da degradação do RNAm pelo processo de interferência por RNA.

Esses resultados abrem várias possiblidades de se ter um sistema para administração de siRNAs para diferentes alvos e com capacidade de co-encapsulação de outras moléculas ativas, fazendo desta nanopartícula híbrida um sistema multifuncional com possível efeito sinérgico no tratamento de diversas patologias.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Active Standard ASTM E2834 | Developed by Subcommittee: E56.02. Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). **Book of Standards Volume:** 14.02. 2012.

AKINC, A.; THOMAS, M.; KLIBANOV, A. M.; LANGER, R.; Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. **Journal of Gene Medicine**, v.7, n.5, p.657-663, 2005.

ALDAWSARI, M.; CHOUGULE, M. B.; BABU, R. J. Progress in Topical siRNA Delivery Approaches for Skin Disorders. **Current Pharmaceutical Design,** v.21, p.000-000, 2015.

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

AL-SAIKHAN, F. I. The gene therapy revolution in ophthalmology. **Saudi Journal of Ophthalmology,** 2013.

ALVES, E. A. & GUIMARÃES, A. C. R. Conceitos e Métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2 / cp 5 – Cultivo Celular. - Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/ Instituto Oswaldo Cruz, 2010.

ANDREWS, G. P.; ZHAI H.; TIPPING S.; JONES D. S. Characterisation of the Thermal, Spectroscopic and Drug Dissolution Properties of Mefenamic Acid and Polyoxyethylene–Polyoxypropylene Solid Dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 98, n.12, p. 4545-4556, 2009.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. da R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of food technology,** v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

ATTAMA, A.A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.** v. 315, n. 1-3, p. 189–195, 2008.

BARBIERI, J. S.; WANAT, K.; SEYKORA, J. Skin: Basic Structure and Function. **Pathobiology of Human Disease**, p. 1134–1144, 2014.

BIVAS-BENITA, M.; ROMEIJN, S.; JUNGINGER, H. E.; BORCHARD, G. PLGA–PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v.58, p.1–6, 2004.

BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DEPIERI, L. V.; KOOIJMANS, S. A. A.; DINIZ, H.; CALZZANI, R. A. J.; VICENTINI F. T. M. C.; MEEL, R. V. D.; FANTINI M. A. C.; LYOMASA M. M.; SCHIFFELERS, R. M.; BENTLEY M. V. L. B. An *in situ* gelling liquid crystalline system based on monoglycerides and polyethylenimine for local delivery of siRNAs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 103-117, 2015.

BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DEPIERI, L. V.; DINIZ, H.; CALZZANI, R. A. J.; FANTINI, M. C. A.; IYOMASA, M. M.; VICENTINI, F. T. M. C.; BENTLEY, M. V. L. B. Self-assembling gelling formulation based on a crystalline-phase liquid as a non-viral vector for siRNA delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v.58, p.72–82, 2014.

BORGHETI-CARDOSO, L. N.; KOOIJMANS, S. A. A.; FENS, M. H. A. M.; MEEL, R. V. D.; VICENTINI, F. T. M. C.; FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M. V. L. B.; SCHIFFELERS, R. M. In Situ Gelling Liquid Crystalline System as Local siRNA Delivery System. **Molecular Pharmaceutics** XXXX, XXX, XXX−XXX, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01141, 2017.

BOSEA, S.; DUC, Y.; TAKHISTOVC, P.; MICHNIAK-KOHNA, B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **International Journal of Pharmaceutics,** v.441, p.56–66, 2013.

BOUDREAU, R. L.; MARTINS, I.; DAVIDSON, B. L. Artificial MicroRNAs as siRNA Shuttles: Improved Safety as Compared to shRNAs *In vitro* and *In vivo* **Molecular Therapy***,* v. 17, n. 1, p.169–175, 2009.

BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to intertechnique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 387, p. 35-42, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 1. ed. Brasília, DF, 2004.

BRUBACH, J.; JANNIN, V.; MAHLER, B.; BOURGAUX, C.; LESSIEUR, P.; ROY, P.; OLLIVON, M. Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 336, p. 248-256, 2007.

BRUNO, K. Using drug-excipient interactions for siRNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, p.1210-1226, 2011.

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

CARDARELLI, F.; DIGIACOMO, L.; MARCHINI, C.; AMICI, A.; SALOMONE, F.; FIUME, G.; ROSSETTA, A.; GRATTON, E.; POZZI, D. & CARACCIOLO, G. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine based transfection reagents and its implication for gene delivery. **Scientific Reports** DOI: 10.1038/srep25879 2016.

CARVALHO, S. M.; NORONHAA, C. M.; FLORIANIA, C. L.; LINOA, R. C.; ROCHA, G.; BELLETTINIB, I. G.; OGLIARIA, P. J.; BARRETO, P. L. M. Optimization of -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. **Industrial Crops and Products**, v.49, p.278–285, 2013.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release,** v. 141, p. 277–299, 2010.

CHEOW, W. S.; HADINOTO, K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid–polymer hybrid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.85, p.214–220, 2011.

CHONG, R. H. E.; GONZALEZ-GONZALEZ, E.; LARA, M. F.; SPEAKER, T. J.; CONTAG, C. H.; KASPAR, R. L.; COULMAN, S. A.; HARGEST, R.; BIRCHALL, J. C. Gene silencing following siRNA delivery to skin via coated steel microneedles: *In vitro* and *in vivo* proof-of-concept. **Journal of Controlled Release**, v.166, p.211–219, 2013.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, **Methods in Molecular Biology**, v.697, p. 63-70, 2010

COLOME, L.M.; RAFFIN, R.P.; ASSUMPCAO, E.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Theospheres based on theobroma grandiflorum seed butter: development of innovative nanoparticles for skin application. **SOFT MATERIALS**, v. 8, p. 72-88, 2010.

CONDE, J.; AMBROSONE, A.; HERNANDES, Y.; TIAN, F.; MCCULLY, M.; BERRY, C. C.; BAPTISTA, P. V.; TORTIGLIONE, C.; DE LA FUENTE, J. M. 15 years on siRNA delivery: Beyond the State of the art on inorganic nanoparticles for RNAi therapeutics. **Nano Today**, v.10, p.421-450, 2015.

CZEKANSKA, E. M. Assessment of Cell Proliferation with Resazurin-Based Fluorescent Dye. Springer Protocol. **Mammalian Cell Viability**, v 740, p 27-32, 2011.

DALBY, B.; CATES, S.; HARRIS, A.; OHKI, E. C.; TILKINS, M. L.; PRICE, P. J.; CICCARONE, V. C. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. **Methods,** v.33, p.95–103, 2004.

DAUDÉN, E.; CASTAÑEDA, S.; SUÁREZ, C.; GARCÍA-CAMPAYO, J.; BLASCO, A. J.; AGUILAR, M. D.; FERRÁNDIZ, C.; PUIG, L.; SÁNCHEZ-CARAZO, J. L. Integrated Approach to Comorbidity in Patients With Psoriasis. **Actas Dermosifiliograficas**, v.103(Supl 1), p.1–64, 2012.

DAVID, A. L. & PEEBLES, D. Gene therapy for the fetus: is there a future? **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 22, Nº. 1, p. 203–218, 2008

DE LOUISE, L. A. Applications of Nanotechnology in Dermatology. **Journal of Investigative Dermatology**. v.132, p.964–975, 2012.

DE PAULA, D.; BENTLEY, M. V. L. B. MAHATO, R. I. Hydrophobization and Bioconjugation for Enhanced siRNA Delivery and Targeting. **RNA. Ribonucleic Acid**, v. 13, p. 431-456, 2007.

DEPIERI, L. V. Dissertação de mestrado. Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais liquidos para veiculação de siRNA na terapia genica. FCFRP-USP, 2012.

DERMATOLOGIA, S.B. **Censo Dermatológico 2006.** Disponível em: <http://www.sbd.org.br/atualidade/censo.htmL>. Consulta em abril de 2013.

ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. **Pharmaceutical Research,** v. 8, p. 47–54, 1991.

ERDŐ, F.; HASHIMOTO, N.; KARVALY, G.; NAKAMICHI, N.; KATO, Y. Critical evaluation and methodological positioning of the transdermal microdialysis technique. A review. **Journal of Controlled Release**. v.233, p.147–161, 2016.

FANG, J.-Y; FANG, C.-L; LIU, C.-H.; SU, Y.-H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.70, p.633–640, 2008.

FELETAR, M.; FOLEY, P.; BROWN, M. Developments in psoriasis and psoriatic arthritis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 1, p. 47-54, 2008.

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

FILIPE, V.; HAWE,A;. JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, 2010.

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

FRANÇA, N. R.; JUNIOR, D. M.; LIMA, A, B.; PUCCI, F. V. C.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n.6, p.695-702, 2010.

FREITAS, C.; MULLER, R. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v. 47, p. 125- 132, 1999

FRICKER, G.; KROMP, T.; WENDEL, A.; BLUME, A.; ZIRKEL, J.; REBMANN, H.; SETZER, C.; QUINKERT, R.-O.; MARTIN, F.; MÜLLER-GOYMANN, C. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharmaceutical Research,** v. 27, p. 1469–1486, 2010.

GARY, D. J.; PURI, N.; WON, Y. Y. Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. **Journal of Controlled Release,** v.121, p.64–73, 2007.

GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow distribution. **US Patent Nº 5250236,** 1993.

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

GRACE R. NAKAYAMA, MAUREEN C. CATON, MICHAEL P. NOVA, ZAHRA PARANDOOSH. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods,** v.204, p.205–208, 1997.

GUHAGARKAR, S. A.; MALSHE, V. C.; DEVARAJAN, P. V. Nanoparticles of Polyethylene Sebacate: A New Biodegradable Polymer. **PharmSciTech,** v. 10, n. 3, p. 935-942, 2009.

GUNTER, M.; LIPKA, J.; MALEK, A.; GUTSCH, D.; KREYLING, W.; AIGNER, A. Polyethilenimines for RNAi-mediated gene targeting *in vivo* and siRNA delivery to the lung. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.77, n.3, p.438-449, 2011.

GUO, J.; BOURRE, L.; SODEN, D. M.; O'SULLIVAN, G. C.; O'DRISCOLL, C. Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? **Biotechnology Advances**, v.29, p.402–417, 2011.

GUO, P.; COBAN, O.; SNEAD, N. M.; TREBLEY, J.; HOEPRICH, S.; GUO, S.; SHU, Y. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. **Advanced drug delivery reviews**, v.62, p.650-666, 2010.

GUZMAN-VILLANUEVA, D.; EL-SHERBINY, I. M.; VLASSOV, A. V.; HERRERA-RUIZ, D.; SMYTH, H. D.C. Enhanced cellular uptake and gene silencing activity of siRNA molecules mediated by chitosan-derivative nanocomplexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p. 579–590, 2014.

HAMDANI, J.; MOËS A. J.; AMIGHI K. Physical and thermal characterisation of Precirol® and Compritol® as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled-release matrix pellets. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 260, p. 47–57, 2003.

HATTORI, Y.; KAWAKAMIM, S.; NAKAMURA, K.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by *in vivo* gene delivery with mannosylated lipoplex via the intraperitoneal route. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v.318, p. 828-834, 2006.

HE, S-N; LI, Y-L; YAN, J-J; ZHANG, W.; DU, Y-Z; YU, H-Y; HU, F-Q; YUAN, H. Ternary nanoparticles composed of cationic solid lipid nanoparticles, protamine, and DNAfor gene delivery. **International Journal of Nanomedicine,** v. 8, p. 2859–2869, 2013.

HIPPALGAONKAR, K.; ADELLI,G. R.; HIPPALGAONKAR, K.; REPKA, M. A.; MAJUMDAR, S. Indomethacin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Ocular Delivery: Development, Characterization, and *In vitro* Evaluation. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics,** v. 29, nº 2, 2013

HSU, J-P; NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 259 p.374–381, 2003.

HU, F.-Q.; ZHANG, Y.; DU, Y.-Z.; YUAN, H. Nimodipine loaded lipid nanospheres prepared by solvent diffusion method in a drug saturated aqueous system. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 348, p. 146-152, 2008.

HUNG, C. F.; LU, K. C.; CHENG, T. L.; WU, R. H.; HUANG, L. Y.; TENG, C. F.; CHANG, W. T. A novel siRNA validation system for functional screening and identification of effective RNAi probes in mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.346, p.707-720, 2006.

IBRAHEEM, D.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Gene therapy and DNA delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 459, p.70– 83, 2014.

JACKSON, A. L.; LINSLEY, P. S. Recognizing and avoiding siRNA offtarget effects for target identification and therapeutic application. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, p. 57 – 67, 2010.

KALAIARASU, L. P.; SUBRAMANIAN, V.; SOWNDHARRAJAN, B.; VELLAICHAMY, E. Insight into the Anti-Inflammatory Mechanism of Action of Atrial Natriuretic Peptide, a Heart Derived Peptide Hormone: Involvement of COX-2, MMPs, and NF-kB Pathways. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics.** DOI 10.1007/s10989-016-9525-9

KALINOWSKI, F. C.; GILES, K. M.; CANDY, P. A.; ALI, A.; GANDA, C.; EPIS, M. R.; WEBSTER, R. J.; LEEDMAN, P. J. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and Erlotinib Sensitivity in Head and Neck Cancer Cells by miR-7. **PLoS ONE**, v.7, n.10, p.e47067, 2012.

KANG H.; ARMENTROUT R. S.; WANG J.; LONG T. E. Synthesis and characterization of ionic and non-ionic terminated amorphous poly(ethylene isophthalate). **Functional Condensation Polymers.** Ch18, p 249-261, 2002.

KHALIL, I. A.; KOGURE, K.; AKITA, H.; HARASHIMA, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. **Pharmacological Reviews,** v.58, p.32-45, 2006.

KHATTAR, H.; SINGH, S.; MURTHY, R. S. R. Formulation and characterization of nano lipid carrier dry powder inhaler containing ciprofloxacin hydrochloride and N-acetyl cysteine. **International Journal of Drug Delivery**, v. 4, p. 316-325, 2012

KIGASAWA, K.; KAJIMOTO, K.; HAMA, S.; SAITO, A.; KANAMURA, K.; KOGURE, K. Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p.157–160, 2010.

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

KONG, B.; SEOG, J. H.; GRAHAM, L. M.; LEE, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine** (Lond), v.6, n.5, p.929–941, 2011

KOVACEVIC, A.; SAVIC, S.; VULETA, G.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 406, p. 163-172, 2011.

KUSHWAHA, A. K.; VUDDANDA, P. R.; KARUNANIDHI, P.; SINGH, S. K.; SINGH, S. Development and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of Raloxifene Hydrochloride for Enhanced Bioavailability. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Basic Science, Medicine** v. 41, n. 6, p. 317 – 320, 2013.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **MEDICINE**. v.45, p.347-351, 2017.

LI, J.; CHEN, Y-C.; TSENG, Y-C.; MOZUMDAR, S.; HUANG, L. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. **Journal of Controlled Release** v.142, p.416–421, 2010.

LI, C.; GE, X.; WANG, L. Construction and comparison of different nanocarriers for co-delivery of cisplatin and curcumin: A synergistic combination nanotherapy for cervical cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v.86, p.628–636, 2017.

LIANG, B., HE, M-L., XIAO, Z-P , LI, Y., CHAN, C-Y, KUNG, H-F, SHUAI, X-T, PENG, Y. Synthesis and characterization of folate-PEG-grafted-hyperbranched-PEI for tumor-targeted gene delivery. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.367, p.874–880, 2008.

LIN, Y. K.; YANG, S. H.; CHEN, C. C.; KAO, H. C.; FANG, J. Y. Using imiquimod-induced psoriasis-like skin as a model to measure the skin penetration of anti-psoriatic drug. **PLoS ONE**, v.10, n.9, p.1-19, 2015.

LIU W. L.; STEVENSON, M.; SEYMOUR, L. W.; FISHER, K. D. Quantification of siRNA using competitive qPCR. **Nucleic Acids Research**, v.37, n.1, p.e4, 2009.

LOPES, L. B. ; FURNISH, E. ; KOMALAVILAS, P.; BRANDON, S. L. ; PANITCH, A.; BENTLEY, M. V. L. B; BROPHY, C. M . Enhanced skin penetration of P20 phosphopeptide using protein transduction domains. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** , v. 31, p. 81-89, 2008.

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

MA, P.; LI, T.; XING, H.; WANGD, S.; SUNE, Y.; SHENGF, X.; WANG, K. Local anesthetic effects of bupivacaine loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.89, p.689–695, 2017.

MAK, R.; HUNDHAUSEN, C.; NESTLE, F. Progress in Understanding the Immunopathogenesis of Psoriasis Progress in Understanding the Immunopathogenesis of Psoriasis. **Actas Dermosifiliográfica**, v. 100, n. 2, p. 2-13, 2009.

MALVERN STRUMENTS. Disponível em: <http://www.malvern.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/> Acessado em 19 de agosto 2016.

MANDAL, B.; BHATTACHARJEE, H.; MITTAL, N.; SAH, H.; BALABATHULA, P.; THOMA, L. A.; WOOD, G. C. Core–shell-type lipid–polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, p. 474–491, 2013.

MARCATO, P. D.; ADAMI, L.F.; CAVERZAN, J. ; HUBER, S. C.; MISSET, T.; DEN HERTOG, J. ; FERREIRA, C. V.; DURÁN, N. Solid Lipid Nanoparticles as Sunscreen Carrier System and its Toxicity in Zebrafish Embryos. In: The IASTED International Conference on Nanotechnology and Applications, **Creta. Nanotechnology and Applications**. Calgary: Acta Press: A Scientific and Technical Publishing Company; v. 615, 2008

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletronica de Fármacia**; v. 6, p. 1-37, 2009.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 47, p. 165-196, 2001.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. “Solid Lipid Nanoparticles ☆ Production , Characterization and Applications.” **Advanced Drug Delivery Reviews** v.64, p.83–101, 2012.

MÜLLER, R. H.; LUCKS, J. S. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN). **European Patent Nº 0605497.** Germany, 1996.

MÜLLER, R. H.; RUNGE, S. A.; RAVELLI, V.; THÜNEMANN, A. F.; MEHNERT, W; SOUTO, E. B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 68, n. 3, p. 535-544, 2008.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-a in phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology.** v.71, p.1331–1336, 2006.

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, n.4. p.279-289, 1990.

NAVARRO, G.; ESSEX, S.; SAWANT, R. R.; BISWAS, S.; NAGESHA, D.; SRIDHAR, S.; ILARDUYA, C. T.; TORCHILIN, V. P. Phospholipid-modified polyethylenimine-based nanopreparations for siRNA–mediated gene silencing: Implications for transfection and the role of lipid components**. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and. Medicine,** v.10, p. 411–419, 2014.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quimica Nova***,* v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011

NESTLE, F.; KAPLAN, D.; BARKER, J. Psoriasis: mecanisms of disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 1710, p. 496-509, 2009.

NEWA M.; BHANDARI K. H.; LI D. X.; KWON T. H.; KIM J. A.; YOO B. K.; WOO J. S.; LYOO W. S.; YONG C. S.; CHOI H. G.; Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of ibuprofen binary solid dispersions with Poloxamer 188® . **International Journal of Pharmaceutics**. v. 343, p. 228-237, 2007.

OH, Y.; PARK, T.G. siRNA delivery systems for cancer treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 61, p.850-862, 2009.

OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C-H.; MULLER, R. H.; KNEUER, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. **Journal of Controlled Release**. v.77, p. 345–355, 2001.

OLBRICH, C.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN) effect of surfactants, storage time and crystallinity. **International Journal of Pharmaceutics,** v.237, p.119–128, 2002.

OLIVEIRA, S.; FRETZ, M. M.; HØGSET, A.; STORM, G.; SCHIFFELERS, R. M. Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth fator receptor through improved endosomal escape of siRNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1768, p.1211–1217, 2007.

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

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics,** v.366, p.170–184, 2009.

PESTANA, K. C.; FORMARIZ, T.P.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 253–259, 2008.

PETERSEN, H.; FECHNER, P. M.; FISCHER, D.; KISSEL, T. Synthesis, Characterization, and Biocompatibility of Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) Block Copolymers. **Macromolecules**, v. 35, p. 6867-6874, 2002.

PETRILLI, R., J. O. ELOY, F. S. G. PRAÇA, J. O. DEL CIAMPO, M. A. C. FANTINI, M. J. V. FONSECA, AND M. V. L. B. BENTLEY. Liquid Crystalline Nanodispersions Functionalized with Cell-Penetrating Peptides for Topical Delivery of Short-Interfering RNAs: A Proposal for Silencing a Pro-Inflammatory Cytokine in Cutaneous Diseases. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, p.1–13, 2016

PRASAD, P.; SHUHENDLER, A.; CAI, P.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Doxorubicin and mitomycin C co-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles inhibit growth of sensitive and multidrug resistant human mammary tumor xenografts. **Cancer Letters** v.334, p.263–273, 2013.

PRASAD, P.; CHENG, J.; SHUHENDLER, A.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. A novel nanoparticle formulation overcomes multiple types of membrane efflux pumps in human breast cancer cells. **Drug Delivery and Translational Research**. v.2, p.95–105, 2012.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J.- M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063–1072, 2008.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, p.470–491, 2011.

PUIG, L.; JULIÀ, A.; MARSAL, S. The Pathogenesis and Genetics of Psoriasis. **Actas Dermosifiliográficas,** v. 105, n. 6, p.535---545, 2014

QI, R.; KIU, S.; CHEN, J.; XIAO, H.; YAN, L.; HUANG, Y.; JING, X. Biodegradable copolymers with identical cationic segments and their performance in siRNA delivery. **Journal Controlled Release**, v. 159, p. 251-260, 2012.

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

RIBEIRO, C. Cosmetologia aplicada a dermocosmética. 2ª edição, São Paulo: **Pharmabooks,** 2010.

RIDOLFIA, D. M.; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDI, L.; MACHADO, D.; DURÁN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.93, p.36–40, 2012.

RUSSELL W. M. S.; BURCH, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique. 1959

SAWANT, R. R.; SRIRAMAN, S. K; NAVARRO, N.; BISWAS, S.; DALVI,R. A.; TORCHILIN, V. P. Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. **Biomaterials**, v.33, p. 3942-3951, 2012.

SCHATZLEIN, A. G.; UCHEGBU, I. F. Polymers in Drug Delivery. 1ª edição: **CRC Press,** 2006.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **The Journal of Clinical Investigation,** v. 116, p. 1150 – 1158, 2006.

SENGEL-TURK, C. T.; HASCICEK, C. Design of lipid-polymer hybrid nanoparticles for therapy of BPH: Part I. Formulation optimization using a design of experiment approach **Journal of Drug Delivery Science and Technology,** v.39, p.16e27, 2017.

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

SHI, J.; XIAO, Z.; VOTRUBA, A. R.; VILOS, C.; FAROKHZAD, O. C. Differentially Charged Hollow Core/Shell Lipid–Polymer–Lipid Hybrid Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery. **Chem.** v.123, p.7165 –7169, 2011.

SHI, J.; XU, Y.; XU, X.; ZHU, X.; PRIDGEN, E.; WU, J.; VOTRUBA, A. R.; SWAMI, A.; ZETTER, B. R.; FAROKHZAD, O. M. Hybrid lipid–polymer nanoparticles for sustained siRNA delivery and gene silencing. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** v.10, p.897–900, 2014.

SIDDIQUI, A.; ALAYOUBI, A.; EL-MALAH, Y.; NAZZAL, S. Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM). **Pharmaceutical Development Technology.**; vol. 19, p. 342-346, 2014.

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

SITTERBERG, J.; ÖZCETIN, A.; EHRHARDT, C.; BAKOWSKY, U. Utilizing atomic force microscopy for the characterization of nanoscale drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.74, p.2–13, 2010.

SMEDEN, J. V.; JANSSENS, M.; GOORIS, G. S.; BOUWSTRA, J.A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1841, p.295–313, 2014.

TAKAHASHI, K.; KATO, H.; SAITO, T., MATSUYAMA, S., KINUGASA, S. Precise Measurement of the Size of Nanoparticles by Dynamic Light Scattering with Uncertainty Analysis. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 25, p. 31-38, 2008.

THADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formations and stability of nanoemulsions. **Advance in Colloid and Interface Science**, v. 108 – 109, p. 303 – 318, 2004.

ULASOV, A. V.; KHRAMTSOV, Y. V.; TRUSOV, G. A.; ROSENKRANZ, A. A.; SVERDLOV, E. D.; SOBOLEV, A. S. Properties of PEI-based Polyplex Nanoparticles That Correlate With Their Transfection Efficacy **Molecular Therapy**, v.19, no. 1, p.103–112, 2011

VAN DER KROL, A. R.; MUR, L. A.; BELD, M.; MOL, J. N. M.; STUITJE, A. R. Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. **The Plant Cell**, v.2, n.4, p.291-299, 1990.

VICENTINI, F. T. M. C.; BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DEPIERI, L. V.; MACEDO MANO, D.; ABELHA, T. F.; PETRILLI, R.; BENTLEY, M. V. L. B. Delivery Systems and Local Administration Routes for Therapeutic siRNA. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 915-931, 2013a.

VICENTINI, F. T. M. C.; DEPIERI, L. V.; POLIZELLO, A. C. M.; CIAMPO, J. O. D.; SPADARO, A. C. C., FANTINI, M. C. A.; BENTLEY, M. V. L. B. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharma,** v.83, p.16–24, 2013b.

VITONYTE, J.; MANCA, M. L.; CADDEO, C.; VALENTI, D.; PERIS, J. E.; USACH, I.; NACHER, A.; MATOS, M.; GUTIÉRREZ, G.; ORRÙ, G.; FERNÀNDEZ-BUSQUETS, X.; FADDA, A. M.; MANCONI, M. Bifunctional viscous nanovesicles co-loaded with resveratrol and gallic acid for skin protection against microbial and oxidative injuries. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v.114, p.278–287, 2017.

WAN, C.; ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. **Drug Delivery and Translacional Research**, 2013

WHITEHEAD, K.A.; LANGER, R.; ANDERSON, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery,** v. 8, p. 129-139, 2009.

WOLFRUM, C.; SHI, S.; JAYAPRAKASH, K. N.; JAYARAMAN, M.; WANG, G.; PANDEY, R. K.; RAJEEV, K. G.; NAKAYAMA, T.; CHARRISE, K.; NDUNGO, E. M.; ZIMMERMANN, T.; KOTELIANSKY, V.; MANOHARAN, M. & STOFFEL, M. Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. **Nature** Biotechnology, v.25, n.10, p.1149-1157, 2007.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Development of Solid Lipid Nanoparticles Containing Ionically Complexed Chemotherapeutic Drugs and Chemosensitizers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, n.8, 2004.

WONG, H. L.; BENDAYAN, R., RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. **Journal of Controlled Release** v.116, p.275–284, 2006.

WU, X. Y. Strategies for optimizing polymer-lipid hybrid nanoparticle-mediated drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.13, n.5., p. 609–612, 2016.

XU, J.; GANESH, S.; AMIJ, M. Non-condensing polymeric nanoparticles for targeted gene and siRNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, p. 21–34, 2012.

ZAKREWSKY, M.; KUMAR, S.; SAMIR MITRAGOTRI. Nucleic acid delivery into skin for the treatment of skin disease: Proofs-of-concept, potential impact, and remaining challenges. **Journal of Controlled Release** xxx (2015) xxx–xxx

ZHANG, L.; CHAN, J. M.; GU, F. X.; RHEE, J. W.; WANG, A. Z.; RADOVIC-MORENO, A. F.; ALEXIS, F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Self-Assembled Lipid_Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. **American Chemical Society**. v.2, n.8, 2008.

ZHANG, R. X.; CAI, P.; ZHANG, T.; CHEN, K.; LI, J.; CHENG, J.; PANG, K. S.; ADISSU, H. A.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Polymer–lipid hybrid nanoparticles synchronize pharmacokinetics of co-encapsulated doxorubicin–mitomycin C and enable their spatiotemporal co-delivery and local bioavailability in breast tumor. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v.12, p.1279–1290, 2016.

ZHAO, X.; LI, F.; LI, Y.; WANG, H.; REN, H.; CHEN, J.; NIE, G.; HAO, J. Co-delivery of HIF1a siRNA and gemcitabine via biocompatible lipid polymer hybrid nanoparticles for effective treatment of pancreatic cancer. **Biomaterials**, v.46, p.13e25, 2015.

ZHU, L.; PERCHE, F.; WANG, T.; TORCHILIN, V. P. Matrix metalloproteinase 2-sensitive multifunctional polymeric micelles for tumor-specific co-delivery of siRNA and hydrophobic drugs. **Biomaterials,** v.35, p. 4213-4222, 2014.