

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Lívia Neves Borgheti Cardoso

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Lívia Neves Borgheti Cardoso

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

Ribeirão Preto
2012

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

Borgheti-Cardoso, Livia Neves

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

107 p.; 30cm.

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

Orientadora: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

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

RESUMO

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia Gênica – Interferência de RNA (RNAi)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

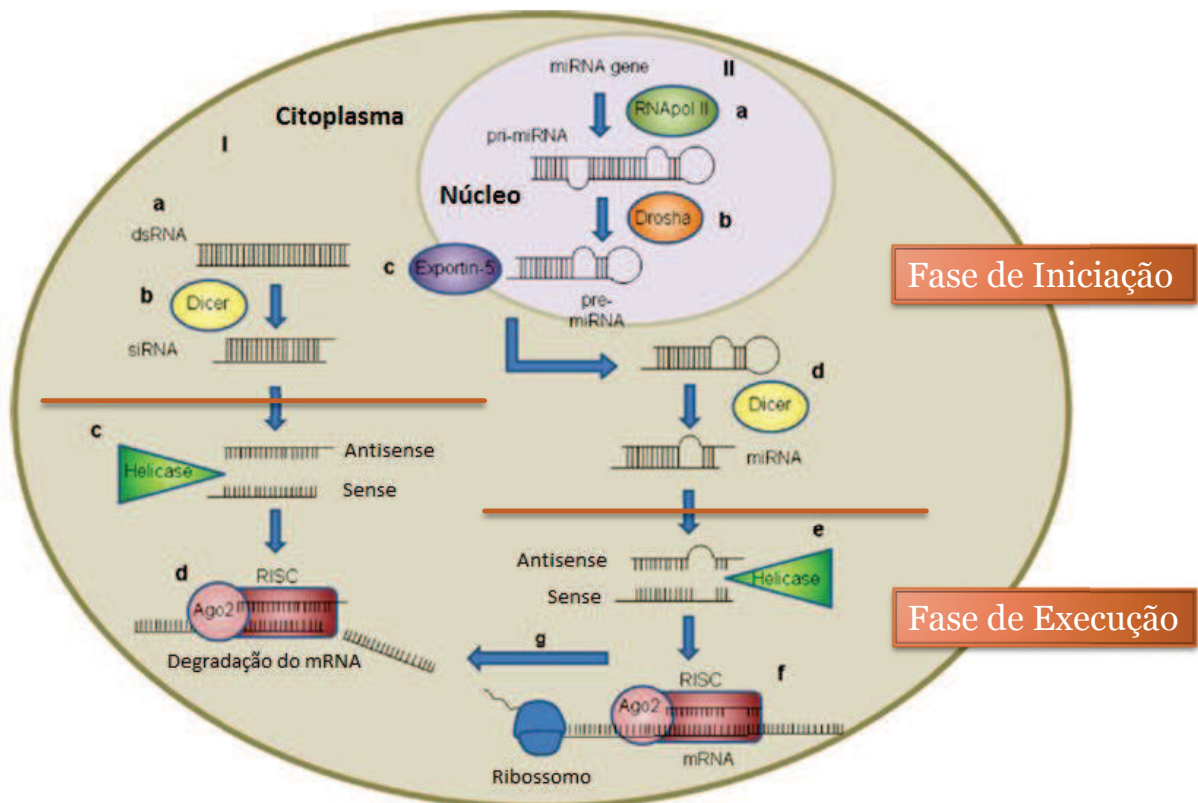


Figura 1: Mecanismo de interferência de RNA. Adaptado de SIFUENTES-ROMERO, *et al.* (2011).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

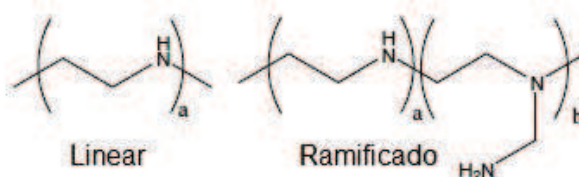


Figura 2: Estrutura molecular do polímero catiônico PEI. Adaptado de DE *et al.* (2009).

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. Sistemas de liberação sustentada - Cristais Líquidos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

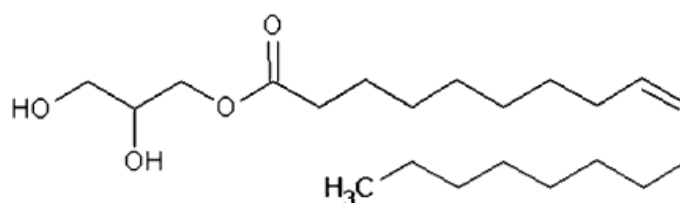


Figura 4: Estrutura química da MO (KULKARNI *et al.*, 2011).

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

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

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

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

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

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

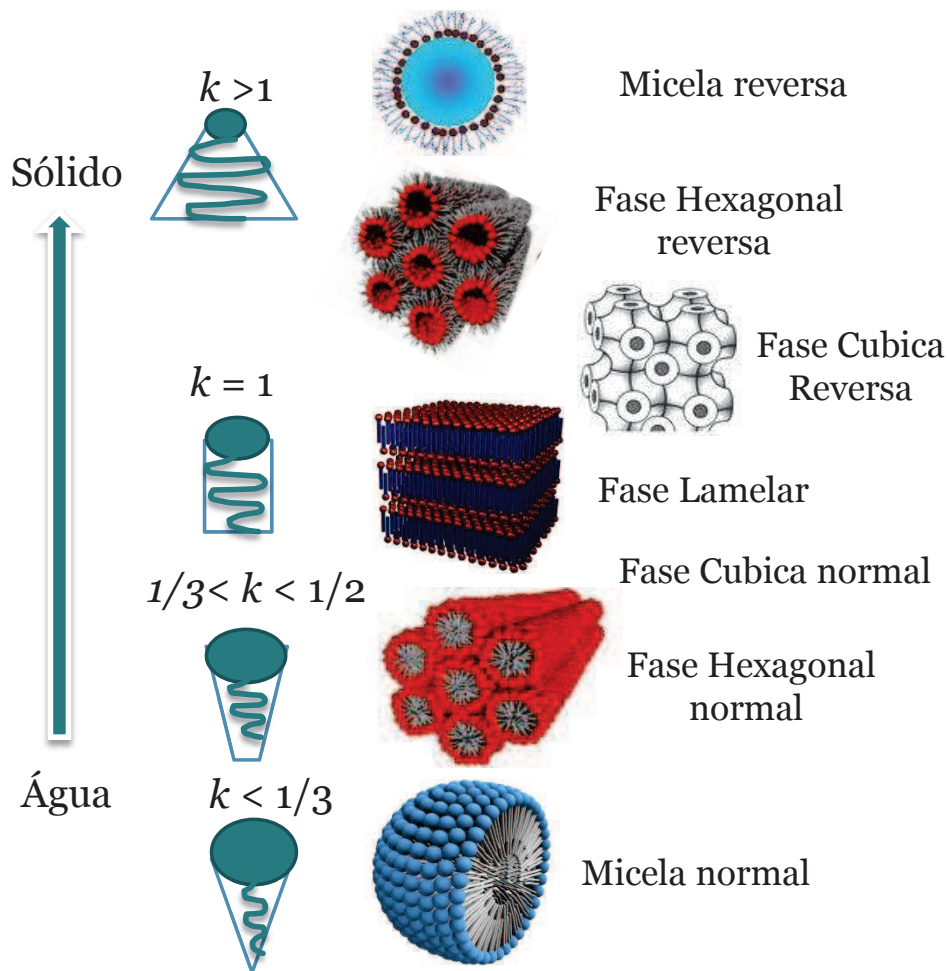


Figura 5: Estruturas líquido cristalinas formadas dependendo do parâmetro de empacotamento, teor de água e temperatura. Adaptado de BORNÉ *et al.*, (2001).

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

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

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

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

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

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

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



5. CONCLUSÃO

A discussão dos resultados obtidos permitiu concluir que:

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

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



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LOPES, L. B.; LOPES, J. L.; OLIVEIRA, D. C.; THOMAZINI, J. A.; GARCIA, M. T.; FANTINI, M. C.; COLLETT, J. H. e BENTLEY, M. V. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of in vitro and in vivo delivery. **Eur.J.Pharm.Biopharm.** v. 63, n. 2, p. 146-155, 2006b.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SHEN, Y.; WANG, B.; LU, Y.; OUAHAB, A.; LI, Q. e TU, J. A novel tumor-targeted delivery system with hydrophobized hyaluronic acid-spermine conjugates (HHSCs) for efficient receptor-mediated siRNA delivery. **Int.J.Pharm**. v. 414, n. 1-2, p. 233-243, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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