

OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE INCUBAÇÃO DA POLIETILENOÍMINA COMO AGENTE TRANSFECTANTE EM FIBROBLASTOS SUÍNOS

Andressa Pereira de Souza¹, Emanuelle Coldebella², Francisco Noé da Fonseca³, Carlos André da Veiga Lima Rosa⁴ e Mariana Groke Marques⁵

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, dressaps_souza@hotmail.com

²Graduanda em Medicina Veterinária, pelo Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia

³Analista da Embrapa Suínos e Aves

⁴Docente da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ensino da Região Sul

⁵Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: Vetor não viral, polímeros catiônicos, transfecção.

INTRODUÇÃO

A introdução de genes exógenos em células eucarióticas tem grande importância no desenvolvimento de pesquisas de função gênica, modificação genética de células bem como terapia gênica (1). O sucesso destes procedimentos depende da eficiência dos sistemas de entrega de genes. Os métodos disponíveis para a entrega de genes são classificados em métodos virais e não virais. Os vetores virais são a mais eficiente metodologia de transdução de células devido ao seu mecanismo natural de ultrapassar barreiras celulares, no entanto, os seus componentes imunogênicos podem limitar sua utilização (2). Entre as metodologias não virais, os polímeros catiônicos como a polietilenoimina (PEI) se destacam com uma alternativa para entrega segura e eficiente de genes, devido à sua boa biocompatibilidade, versatilidade e tamanho controlável de moléculas, além disso, são baratos e simples de preparar (3). A PEI é um polímero catiônico, que condensa o DNA em partículas carregadas positivamente, formando complexos que se ligam à resíduos de superfície aniônicos e são levados para dentro da célula por endocitose (4). Apesar de apresentarem muitas vantagens, a eficiência de entrega depende da otimização de alguns parâmetros, como concentração do polímero e tempo de incubação. Fibroblastos, por serem uma célula de fácil obtenção e cultivo *in vitro*, são amplamente utilizados combinados com a técnica de transferência nuclear para produção de animais geneticamente modificados. Além disso, por estarem em mitose e por terem alta produção de proteínas, quando transfectados com sucesso, rapidamente produzem a proteína modificada, desta forma, podendo ser utilizados como teste de eficiência de transfecção/integração de vetores que serão utilizados posteriormente em outros tipos celulares. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar parâmetros de concentração e tempo de incubação para que a PEI seja internalizada em fibroblastos fetais suínos de forma eficiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Os fibroblastos fetais suínos (FFS) utilizados no experimento foram obtidos a partir de um banco de células em terceira passagem criopreservadas em meio DMEM com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO), estabelecidas segundo Souza e Marques (5). Após o descongelamento, os fibroblastos foram cultivados em garrafas de 25 cm² contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 50 UI/mL de gentamicina. Ao atingirem 80% de confluência, os FFS foram tratados com tripsina (tripsina 0,1%, EDTA 0,025% em PBS sem cálcio e magnésio) e semeados em placas de Petri (35mm) para compor os tratamentos. Os FFS foram cultivados por aproximadamente 48h em meio DMEM acrescido de 10% de SFB e 50 UI/mL de Gentamicina. O cultivo foi realizado em estufa incubadora a 37°C, 5% de CO₂ em ar e alta umidade. Ao atingirem 80% de confluência, o meio de cultura foi substituído por DMEM (desprovido de SFB e antibiótico) suplementado com quatro diferentes concentrações de PEI marcada com a sonda FITC, sendo 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL e 4 mg/mL. As células foram incubadas em estufa por 3 (3H) e 6 (6H) horas. A conjugação da PEI ao FITC foi realizada de acordo com Saito e Saitoh (2012). Ao final do período de incubação, o meio de cultura foi retirado e a placa lavada com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 50 UI/mL de gentamicina. Em seguida as células foram removidas da placa com auxílio de scrap. As células foram avaliadas através de citometria de fluxo (BD Accuri™C6), para mensuração da taxa de incorporação de PEI/FITC. Os dados foram avaliados utilizando PROC MIXED (SAS®), sendo verificada a interação entre as variáveis tempo e concentração. O teste de Tukey foi usado para comparar as médias sendo os dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens ± EP. A análise de regressão foi realizada no InStat®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação entre o tempo de incubação e a concentração da PEI/FITC ($p=0.9045$). A internalização da PEI/FITC não foi afetada pelo tempo que os fibroblastos permaneceram em contato com o polímero ($p=0.0693$), sendo que o tempo 3H apresentou uma taxa de internalização de PEI/FITC de $53\% \pm 2,29$ enquanto o tempo 6H de $59\% \pm 2,29$. Quanto à concentração, foi possível observar que quanto maior a concentração maior a internalização da PEI/FITC ($r=0,6382$, $p<0,0001$) (Figura 1A). Os FFS tratados com as concentrações de PEI/FITC de 2 e 4 mg/mL não diferiram entre si ($p= 0.2501$) e apresentaram maiores taxas de internalização da PEI/FITC ($70,88\% \pm 3,63$ e $82\% \pm 3,63$ respectivamente).

As concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL promoveram menores taxas de internalização (33,68%±3,63 e 41,39%±3,63 respectivamente) e não diferindo entre si (p=0.5708), embora a concentração de 0,5 mg/mL não tenha diferido da 1 mg/mL (p=0.1817). A concentração de 1 mg/mL apresentou uma taxa de internalização intermediária (53,12%±3,63), sendo superior a concentração de 0,25 mg/mL (p=0.0065) e inferior a concentrações de 2 mg/mL (p=0.0144) e 4 mg/mL (p<0.0001) (Figura 1B).

CONCLUSÕES

A polietilenoimina mostrou-se capaz de penetrar nos fibroblastos suínos em todas as concentrações avaliadas, sendo que as maiores concentrações permitiram maiores internalizações, sem sofrerem efeito do tempo. Desta forma, se mostrou um método eficiente e barato de transfecção mesmo em células primárias que sabidamente são as mais difíceis para realização da internalização de agentes transfectantes. Porém, mais estudos são necessários para otimizar os demais parâmetros que afetam a eficiência e a citotoxicidade deste polímero para transfecção celular.

REFERÊNCIAS

1. SUN, N.F.; LIU, Z.A; HUANG W.B.; TIAN, A.L; HU, S.Y. The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.89, p.352–357, 2014
2. HSU, C.Y.M.; ULUDAG, H.A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. **Nature Protocols**, v.7, n.5, p.935- 945, 2012.
3. LUNGWITZ, U.; BREUNIG, M.; BLUNK, T.; GOÏPFERICH A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v.60 p.247–266, 2005.
4. GAO, X.; KIM, K.S.; LIU, D. Nonviral gene Delivery: What we know and what is next. **The AAPS Journal**, v.9, n.1, p.92-104, 2007.
5. SOUZA, A. P.; MARQUES, M.G. Estabelecimento de sistema de cultura de fibroblastos fetais suínos. Jornada de Iniciação Científica (11:2017: Concórdia, SC). **Anais da XI Jornada de Iniciação Científica (JINC)**. Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves, p.115-117, 2017.

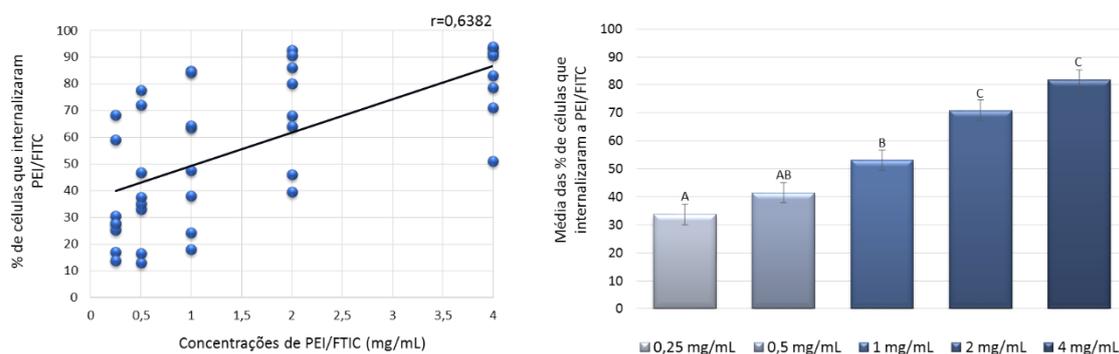


Figura 1. (A) Relação entre a concentração de PEI/FITC e a porcentagem de células que internalizaram a PEI/FITC. (B) Médias das porcentagens de células que internalizaram a PEI/FITC. Os dados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos das porcentagens ± EP. Letras sobrescritas representam diferença significativa (A, B, C).