

## Derivados de quitosana como vetores não virais para transferência gênica: Substituição com grupos fosforilcolina e dietilaminoetil.

Isadora P. D. Picola<sup>1,2</sup> (PQ), Franciele P. P. Oliveira<sup>1</sup> (PG), Qin Shi<sup>3</sup> (PQ), Vera A. O. Tiera<sup>1</sup> (PQ), Júlio C. Fernandes<sup>3</sup> (PQ) e Marcio J. Tiera<sup>1</sup> (PQ) \* [mjt@ibilce.unesp.br](mailto:mjt@ibilce.unesp.br)

<sup>1</sup>Departamento de Química e Ciências Ambientais, <sup>2</sup>Departamento de Física, IBILCE-UNESP Brasil. <sup>3</sup>Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, –Université de Montréal-Canada

Palavras Chave: *Transferência gênica, nanopartículas, pDNA, siRNA, quitosana.*

### Introdução

A utilização de nanopartículas para a transferência de genes é uma das estratégias mais promissoras dentro da terapia gênica não viral, sobretudo devido as múltiplas estratégias empregadas na preparação dos sistemas<sup>1</sup>. Neste tema polications podem ser modificados por meio da inserção de grupos sensíveis ao pH, a fim de aumentar a liberação intracelular do DNA e ou RNA de interferência. Neste estudo, os derivados de quitosana contendo proporções crescentes de dietilaminoetil (DEAE) e grupos fosforilcolina (PC) foram sintetizados com o intuito de melhorar a eficiência de transfeção de quitosana. Os derivados foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e cromatografia de permeação em gel (GPC). O principal objetivo foi o de estudar o efeito da composição do derivado na eficiência de transfeção *in vitro*, utilizando células HeLa. Quitosana desacetilada (Mw 12 kDa) e seus derivados (Tabela 1) contendo 18% de grupos PC (PC<sub>18</sub>-CH) e 22%, 38%, 44% e 58% de grupos dietilaminoetil (PC<sub>18</sub>-CH-DEAEx) foram utilizados para preparar nanopartículas com o plasmídeo VR -1412, que codifica o gene da β-galactosidase (β-gal). As nanopartículas foram preparadas em pH 6,3 em diferentes razões N/P (N = grupos amina do derivado, P = grupo de fosfato de pDNA). A técnica de espalhamento de luz dinâmico foi utilizada para determinar os tamanhos e potenciais zeta dos políplexos e suas estabilidades foram analisadas por eletroforese em gel de agarose. A eficiência de transfeção foi avaliada utilizando-se o kit Elisa para β-gal (ROCHE).

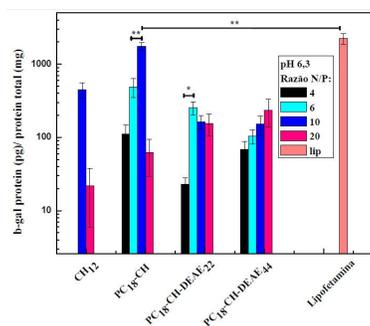
### Resultados e Discussão

As partículas formadas com PC<sub>18</sub>-CH apresentaram tamanhos variando de 50 a 100 nm. Para razões N/P superiores a 2 todos os derivados PC<sub>18</sub>-CH-DEAEx formaram políplexos com potenciais zeta positivos e raios hidrodinâmicos em torno de 100 nm. A citotoxicidade dos derivados substituídos aumentou significativamente para as razões N/P superiores a 15. Nanopartículas preparadas para razões N/P = 10 com PC<sub>18</sub>-CH e PC<sub>18</sub>-CH-DEAE<sub>22</sub>

permitiram obter eficiências de transfeção cerca de seis vezes maior do que aquela obtida com a quitosana desacetilada (CH) e comparáveis à eficiência de transfeção mediada pelo lipídeo comercial Lipofectamina® (Figura 1).

**Tabela 1.** Propriedades dos derivados de quitosana preparados.

Notação	Mw (kDa)	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	%PC	%DEAE
PC <sub>18</sub> -CH <sup>d</sup>	41.0	3.3	18	--
PC <sub>18</sub> -CH-DEAE <sub>22</sub>	29.3	2.3	18	22
PC <sub>18</sub> -CH-DEAE <sub>38</sub>	32.8	2.3	18	38
PC <sub>18</sub> -CH-DEAE <sub>44</sub>	32	2.4	18	44
PC <sub>18</sub> -CH-DEAE <sub>70</sub>	--	--	18	58



**Figura 1.** Eficiência de transfeção dos políplexos preparados com CH<sub>12</sub>, PC<sub>18</sub>-CH, PC<sub>18</sub>-CH-DEAE<sub>22</sub> e PC<sub>18</sub>-CH-DEAE<sub>44</sub> em pH 6,3. Valores de expressão de β-gal/proteína total. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.005.

### Conclusões

Os resultados mostraram que a inserção de grupos amino secundários e terciários permitem aumentar a eficiência de transfeção e podem ser uma alternativa para a terapia gênica não-viral.

### Agradecimentos

Agradecimentos **Fapesp** : 2010/09651-6 e 2011/18692-0

<sup>1</sup> TIERA, M. J. ; SHI, Q. ; BARBOSA, H. F. G. ; FERNANDES, J. C. , *Curr Gene Ther.* **2013**, *13*, 358.