

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Avaliação da complexação da proteína CAS9 e RNA-Guia com diferentes tipos de nanotubos de carbono visando a edição gênica em células e embriões de mamíferos¹

Mariana Venturini Martins Fernandes², Carolina Capobiango Romano Quintão³, Michele Munk Pereira⁴, Naiara Zoccal Saraiva^{5,6}, Luiz Sérgio de Almeida Camargo⁵

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto “Edição genômica em embriões bovinos via sistema CRISPR/Cas9 conjugado com nanopartículas de carbono”, liderado por Luiz Sérgio de Almeida Camargo.

²Graduanda em Medicina Veterinária – Unipac/Juiz de Fora, MG Bolsista PIBIC CNPq. e-mail: marianaventu@gmail.com

³Analista, Laboratório de Reprodução Animal – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora. e-mail: carolina.quintao@embrapa.br

⁴Professora, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). e-mail: michele.munk@ufjf.edu.br

⁵Pesquisador, Laboratório de Reprodução Animal – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora. e-mail: naiara.saraiva@embrapa.br; luiz.camargo@embrapa.br

⁶Orientador

Resumo: Dentre as diversas aplicações dos nanomateriais, ressalta-se a utilização de nanotubos de carbono (NTC) como carreadores não virais de ácidos nucleicos e proteínas para o interior de células e embriões de mamíferos. Os métodos atualmente disponíveis para transfecção possuem limitações, o que estimula o desenvolvimento de métodos alternativos de carregamento de biomoléculas. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência da complexação de dois tipos de NTCs, um carboxilado (MWNT-COOHs) e outro aminado (NTC-O-A), à proteína CAS9 e RNA-guia (sgRNA), para aplicações em edição gênica. Metodologia: Ambos os tipos de NTCs foram sintetizados por deposição química catalítica por vapor e caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Após a síntese, os NTCs foram dispersos com auxílio de agitação ultrassônica (1 minuto), em meio Optimen e preparados de acordo com os seguintes grupos: G1: 0,2 mcg/ml MWNTC-COOH+CAS9+sgRNA; G2: 0,4 mcg/ml MWNTC-COOH+CAS9+sgRNA; G3: 0,2 mcg/ml NTC-O-A+CAS9+sgRNA; G4: 0,4 mcg/ml NTC-O-A+ CAS9+sgRNA; G5: CAS9+ sgRNA; G6: 0,4 mcg/ml MWNTC-COOH; G7: 0,4 mcg/ml NTC-O-A. A fim de se verificar a ocorrência de complexação do NTC com a proteína CAS9 e o sgRNA, foi avaliado o potencial zeta (PZ) de todos os tratamentos, através do equipamento Zetasizer Nano ZN (Malvern, Reino Unido). Resultados: As imagens obtidas pelo MET demonstraram morfologia típica dos nanotubos de carbono. Comparando os valores de PZ nos diferentes grupos, observou-se que o PZ de G6 (-15 mV) foi maior que o PZ de G1 (-4,83 mV) e G2 (-11,38 mV) após complexação, bem como o valor de G7 (13,9 mV) foi maior que o PZ de G3 (8,98) e G4 (8,92), sugerindo que pode ter ocorrido interação dos aminoácidos da proteína CAS9 com os grupamentos funcionais do MWNT-COOH e do NTC-O-A. Conclusão: Os resultados preliminares indicam uma possibilidade de interação entre os nanotubos de carbono avaliados com a proteína CAS9 e o sgRNA, sugerindo que esse nanomaterial possui potencial para aplicações na modificação genética de células e embriões.

Palavras-chave: carbono, complexação, edição, nanotubos, proteína, RNA, potencial zeta

Evaluation of complexation of CAS9 protein and Guide-RNA with different types of carbon nanotubes for gene edition in mammalian cells and embryos

Abstract: Among the various applications of nanomaterials, the use of carbon nanotubes (NTC) as non-viral carriers of nucleic acids and proteins for the interior of mammalian cells and embryos is emphasized. The available methods for transfection have limitations, which stimulate the development of alternative methods of biomolecule carrying. The aim of this study was to evaluate the efficiency of the complexation of two types of NTCs, one carboxylated (MWNT-COOHs) and the other aminated (NTC-O-A), to CAS9 protein and guide-RNA (sgRNA), for gene editing applications. Methodology: Both types of NTCs were synthesized by chemical vapor deposition and characterized by transmission electron microscopy (MET). After synthesis, NTCs were dispersed with ultrasonic agitation (1 minute) in Optimen medium and prepared according to the following groups: G1: 0.2 mcg/ml MWNTC-COOH+ CAS9+ sgRNA; G2: 0.4 mcg/ml MWNTC-COOH+CAS9 + sgRNA; G3: 0.2 mcg/ml NTC-O-A+ CAS9 + sgRNA; G4: 0.4 mcg/ml NTC-O-A+CAS9 +

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

sgRNA; G5: CAS9+ sgRNA; G6: 0.4 mcg /ml MWNT-COOH; G7: 0.4 mcg/ml NTC-O-A. In order to verify the occurrence of NTC complexation with CAS9 protein and sgRNA, the zeta potential (ZP) of all treatments was evaluated using the Zetasizer Nano ZN equipment (Malvern, UK). Results: The images obtained by MET demonstrated a typical morphology of the carbon nanotubes. Comparing the ZP values in the different groups, it was observed that the ZP of G6 (-15 mV) was higher than the PZ of G1 (-4.83 mV) and G2 (-11.38 mV) after complexation, as well as the value of G7 (13.9 mV) was greater than the PZ of G3 (8.98) and G4 (8.92), suggesting that there may have been interaction of the amino acids of the CAS9 protein with functional clusters of MWNT-COOH and NTC-OA. Conclusion: Preliminary results indicate a possibility of interaction between the carbon nanotubes evaluated with the CAS9 protein and sgRNA, suggesting that this nanomaterial has potential for applications in the genetic modification of cells and embryos.

Keywords: carbon, complexation, editing, nanotubes, protein, RNA, potential zeta

Introdução

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar que se desenvolveu rapidamente nos últimos anos. Nanotubos são arranjos hexagonais de carbono e podem ser de camada única (*single wall*) ou multicamadas (*multi-walls*) (MWNT) (Cheung et al., 2010). Os nanotubos de carbono são leves, com elevada resistência mecânica e condutividade elétrica e térmica, e podem ser funcionalizados para que átomos ou moléculas possam ser adsorvidos ou ligados, promovendo assim a interação dos mesmos com moléculas orgânicas ou grupos químicos como fármacos, DNA e proteínas (Fu et al., 2002; Sinnott et al., 2002).

No entanto, como os NTCs são hidrofóbicos, característica indesejada para aplicações biológicas e farmacológicas, são realizados diversos estudos sobre métodos que os modifiquem quimicamente, possibilitando que estes possam solubilizar e dispersar em água, facilitando assim sua manipulação e processamento em ambientes fisiológicos. Essas modificações químicas são denominadas de funcionalização e trazem vantagens por permitirem a solubilização, aumentarem a biodisponibilidade e reduzirem a toxicidade (Calegari, 2015).

A funcionalização promove alteração química na superfície dos nanotubos, adicionando um ou mais grupamentos químicos, o que permite uma alteração nas propriedades dos mesmos facilitando a interação com macromoléculas celulares e tornando-os mais biocompatíveis. Após a síntese e funcionalização, a caracterização dos NTCs é essencial para se obter informações sobre o grau de pureza, ordenamento e distribuição de diâmetro, tamanho e potencial zeta das nanoestruturas. O potencial zeta mede a magnitude de atração ou repulsão eletrostática, constituindo-se, portanto, em um indicador útil da carga das nanopartículas, sendo muito utilizado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Logo, a medida do potencial zeta é um indicador diretamente relacionado à estabilidade de formulações e à caracterização de sistemas nanoparticulados de veiculação de fármacos.

O sistema ideal para *delivery* de moléculas biológicas deve possuir as seguintes características: ser específico ao alvo de interesse, biodegradável, não-tóxico, não-inflamatório, não-imunogênico, estável para ser estocado, ter capacidade para transportar uma quantidade adequada de material genético, com uma boa eficiência de transfecção e de ser produzido em larga escala, com um baixo custo baixo. Os NTCs são bons candidatos pois apresentam baixa toxicidade (para determinados tipos celulares), boa estabilidade e uma grande relação entre área de superfície e volume, o que lhes confere a capacidade de se ligarem a diferentes grupos funcionais e, portanto, agirem em diferentes alvos moleculares com diferentes efeitos terapêuticos (Calegari, 2015).

A utilização do sistema CRISPR/Cas9 como ferramenta para edição gênica em bovinos ainda é recente e uma das dificuldades é a manipulação de embriões em larga escala, como ocorre em vegetais. Atualmente, a técnica mais utilizada é a microinjeção intracitoplasmática, na qual ocorre a injeção citoplasmática da CAS9-sgRNA em cada zigoto individualmente, mas é um processo laborioso, que requer tempo, depende do uso de micromanipuladores e técnicos treinados, o que contribui para redução da viabilidade embrionária. Estudos recentes comprovaram que nanotubos de carbono multicamada são capazes de transpor a zona pelúcida e carrear vetores com sequências gênicas para o interior de zigotos (Munk, et. al., 2016). Com isso, a simples incubação, sem necessidade de manipulação individual de zigotos, deve proporcionar a edição do genoma de um grande número de embriões de modo rápido e simples.

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

No entanto, para o sucesso da edição gênica utilizando NTCs como carreadores de moléculas biológicas para o interior das células e embriões, o primeiro passo é a correta caracterização desses nanomateriais. O valor do potencial zeta está diretamente relacionado às características responsáveis pelos efeitos biológicos dos nanomateriais, como dissolução das nanoestruturas, captação intracelular e toxicidade (Sourav Bhattacharjee, 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade da complexação de diferentes tipos de NTCs com elementos do sistema CRISPR/CAS9, através da análise do potencial zeta.

Material e Métodos

Os NTCs foram sintetizados através do processo de deposição química catalítica por vapor, usando ferroceno e etileno como metais de transição e precursores de carbono. Após a síntese, os NTCs foram submetidos a um processo de purificação por lavagens e filtrações sucessivas utilizando álcool isopropílico para remover impurezas e resíduos remanescentes. Após o processo de purificação, os nanomateriais foram resfriados em freezer -80°C, por 12h (Munk et. al., 2016). Foram sintetizados dois tipos de NTCs, que diferem pela funcionalização, um NTC carboxilado (MWNTC-COOH), carregado negativamente e outro NTC oxidado, aminado (NTC-O-A), carregado positivamente. A caracterização foi feita através de um microscópio eletrônico de transmissão (FEI Tecnai G2 Spirit à 120 kV).

Após a síntese, os NTCs foram adicionados em meio Optimen (Invitrogen) e dispersos sob agitação ultrassônica à 200W de potência e frequência de 24 kHz (UP200, Hieslcher-Germany), durante 1 minuto, à temperatura ambiente (Munk, et.al., 2016). Foram preparados os seguintes tratamentos para análise do potencial zeta: G1: 0,2 mcg/ml MWNTC-COOH + CAS9+sgRNA; G2: 0,4 mcg/ml MWNTC-COOH + CAS9+sgRNA; G3: 0,2 mcg/ml NTC-O-A + CAS9+sgRNA; G4: 0,4 mcg/ml NTC-O-A + CAS9+sgRNA; G5: CAS9+ sgRNA; G6: 0,4 mcg/ml MWNTC-COOH e G7: 0,4 mcg/ml NTC-O-A. O potencial zeta foi determinado através da técnica de microeletroforese por laser (Zetasizer Nano ZN; Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK). No equipamento, são realizadas leituras em triplicata para cada amostra.

Resultados e Discussão

A partir dos resultados obtidos na tabela 1, pode-se comparar os valores de potencial zeta de G6, MWNTC-COOH não complexado, com os grupos G1 e G2, MWNTC-COOH +CAS9+sgRNA e entre os valores de G7, NTC-O-A, com G3 e G4, NTC-O-A+CAS9+sgRNA.

A análise comparativa entre os valores do potencial zeta dos grupos somente com nanotubos de carbono (carboxilado e aminado) daqueles em que foram adicionados a CAS9+sgRNA, pode fornecer um indicativo se houve ou não interação entre os grupos funcionais dos nanotubos de carbono e os aminoácidos da CAS9. Os valores obtidos sugerem melhor complexação do NTC-O-A, carregado positivamente, do que daquele carregado negativamente (MWNTC-COOH).

O pH é um dos principais parâmetros que afeta o potencial zeta. Sabe-se que o ponto isoelétrico, ou seja, o pH no qual o potencial zeta é zero, é o ponto máximo de instabilidade da dispersão, no qual as nanoestruturas, tendem a formar aglomerados e precipitam. Portanto, são necessários mais estudos variando o pH das dispersões, para se obter valores de potenciais zeta maiores (acima de -30 mV ou abaixo de -30 mV). A estabilidade dos complexos de nanotubos com a proteína CAS9 é condição essencial para utilização dos mesmos na transfecção de células e embriões bovinos.

Tabela 1. Potencial Zeta (mV), dos 7 grupos experimentais.

Tratamento	Potencial Zeta (mV)
G1	-4,83
G2	-11,38
G3	8,98
G4	8,92
G5	-6,37
G6	-15
G7	13,9

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Conclusões

A partir dos resultados preliminares de potencial zeta obtidos, conclui-se que o nanotubo de carbono oxidado, aminado (NTC-O-A) apresentou resultados compatíveis de complexação, com a proteína CAS9 e o RNA-guia. No entanto, devem ser realizados mais estudos alterando o pH das dispersões, já que o pH é um dos principais fatores que afetam o potencial zeta e, conseqüentemente, a estabilidade das formulações nanoestruturadas.

Agradecimentos

Agradeço a Embrapa Gado de Leite por me proporcionar tamanha experiência e aprendizado; a todos os membros do Laboratório de Reprodução Animal pela paciência e acompanhamento durante todo o período como bolsista, em especial à Naiara Zoccal Saraiva e Carolina Capobiango Quintão pelo acolhimento, treinamento, orientações e disponibilidade; e ao assistente Joel Vianello pela parceria e amizade ao longo de todo o período.

Referências

CALEGARI, L.P. **Análise do uso de nanotubos de carbono como veículos para aprimorar a transfecção de um candidato vacinal de DNA contra o vírus da dengue**. 2015. 60p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa.

CHEUNG, W.; PONTORIERO, F.; TARATULA, O.; CHEN, A.M.; HE, H. DNA and carbon nanotubes as medicine. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** 62(6): 633, 2010.

FU, K.F.; HUANG, W.J.; LIN, Y.; ZHANG, D.H.; HANKS, T.W.; RAO, A.M.; SUN, Y.P. Functionalization of Carbon Nanotubes with Bovine Serum Albumin in Homogeneous Aqueous Solution. **Journal of NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY**, 2:457, 2002.

MUNK, M.; LADEIRA, L.O.; CARVALHO, BRUNO, C.; CAMARGO, L.S.A.; RAPOSO, N.R.B.; SERAPIÃO, R.V.; QUINTÃO, C.C.R.; SILVA, S.R.; SOARES, J.S.; JORIO, A.; BRANDÃO, H.M. Efficient delivery of DNA into bovine preimplantation embryos by multiwall carbon nanotubes. **Scientific Reports**, 6:33. p.588, 2016.

SINNOTT, S.B. Chemical functionalization of carbon nanotubos. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 2: 113, 2002.

SOURAV, B. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release** 235, 337–351, 2016.