



TRANSFEÇÃO GÊNICA EM FIBROBLASTOS BOVINOS UTILIZANDO NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS

Michele Munk Pereira¹; Nádia Rezende Barbosa Raposo¹; Luiz Sérgio de Almeida Camargo²;
Thamiris Dornelas de Araújo³; Marina de Souza Ladeira⁴; Luiz Orlando Ladeira⁴; Humberto de
Mello Brandão^{2*}

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

³ Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil

⁴ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

*e-mail de contato; humberto@cnpql.embrapa.br

Projeto Componente: PC5 Plano de Ação: PA6

Resumo

Os NTC são promissores nanomateriais que podem ser utilizados como vetores de DNA na transfecção de células de mamíferos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de MWCNT-CHOO atuarem como vetor de transfecção de plasmídeos marcados com GFP em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. Pode-se verificar que o complexo MWCNT-CHOO/pLGW foi capaz de transfectar as células, porém, com menor eficiência quando comparado ao método padrão com o reagente PEI. Assim, novos estudos estão sendo conduzidos para aumentar a taxa de transfecção com este nanomaterial.

Palavras-chave: nanotecnologia, células, animal transgênico.

Introdução

Os nanotubos de carbono (NTC) são nanomateriais formados por arranjos hexagonais de carbono que originam pequenos cilindros [1]. Existem duas classes de NTC: os de parede simples ou únicas (do inglês *single-walled carbon nanotubes* - SWCNT) que são constituídos por apenas uma camada cilíndrica de grafite e os multicamadas (do inglês *multiwalled carbon nanotubes* - MWCNT) que são constituídos de vários cilindros concêntricos de grafite.

Dentre as diversas aplicações desses promissores nanomateriais, ressalta-se a utilização de NTC como vetores não virais de DNA na transfecção de células de mamíferos [2, 3, 4, 5]. A transfecção ocorre por meio de interações hidrofóbicas, nas quais a fita de DNA enrola-se espontaneamente em torno dos NTC [6].

Assim, esses estudos abriram novas perspectivas para a aplicação de NTC na

transfecção de células doadoras de núcleo para a clonagem na produção de animais domésticos transgênicos com características de interesse.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de MWCNT funcionalizados (MWCNT-COOH) atuarem como vetor de transfecção de plasmídeos marcados com GFP em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

Material e métodos

MWCNT -COOH e de elevada pureza (95%) com diâmetro variando de 10-20nm e comprimento de 1-4 μ m foram sintetizados por deposição química de vapor (CVD) no departamento de Física da UFMG. Os NTC foram tratados com UV e diluídos em água livre de nucleases em ultrassom produzindo uma solução homogênea.

A obtenção do DNA foi realizada após amplificação do plasmídeo pLGW contendo o gene

responsável pela expressão da proteína verde fluorescente (GFP) na bactéria *Escherichia coli* DH5 α . Após o crescimento das bactérias em cultura, o pLGW foi purificado com o *Kit Qiagen Plasmid Maxi Purification* (QIAGEN) e armazenadas a -20°C até a sua utilização.

A transfecção foi realizada em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. Inicialmente, os fibroblastos foram semeados na densidade de 3×10^4 em placas de 4 poços por 48 h antes da transfecção. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade.

Quando as células atingiram 60% de confluência, foram transfectadas com MWCNT-CHOO ou com o polímero catiônico polietilenimina - PEI (método controle de transfecção). Para o complexo MWCNT-CHOO/pLGW a proporção de agente transfectante e DNA plasmidial foi de 10:1 e para o complexo PEI/pLGW a relação foi de 1:1.

As células foram incubadas com os complexos por 6 h, e então o meio foi totalmente substituído por DMEM suplementado com 10% SFB. Após 48 h, as células foram visualizadas no microscópio de epifluorescência (BX 52, Olympus, Washington, EUA), usando um filtro de 470-490 nm.

Resultados e discussão

Visando testar a utilização de NTCs como método alternativo de transfecção em fibroblastos bovinos, foram testados a capacidade de transfecção de MWCNT-CHOO e o agente PEI (controle), juntamente com o vetor pLGW contendo o gene GFP. Pode-se verificar que o complexo MWCNT-CHOO/pLGW foi capaz de transfectar as células (Fig. 1C). Porém, observou-se grande quantidade de células GFP positivas utilizando-se o reagente PEI (Fig. 1D). Não foram observadas fluorescências nas células sem DNA plasmidial (Fig. 1A) ou com DNA plasmidial sem agente transfectante (Fig. 1B).

Os NTC podem penetrar nas células por endocitose [7] ou passar livremente pela bicamada lipídica em vários tipos de células somáticas [8] e atingir o núcleo da célula, aumentando a eficiência de transfecção do transgene [9]. Além disso, a ligação não-covalente de ácidos nucleicos na superfície dos nanotubos aumenta a eficiência da liberação do conteúdo na célula [10].

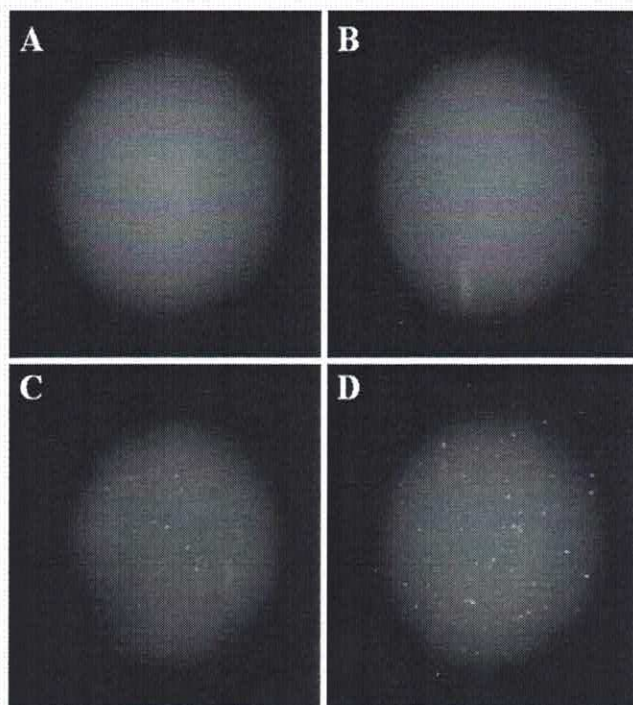


Fig. 1. Capacidade de transfecção de MWCNT-CHOO e PEI em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* com o plasmídeo pLGW. A: controle (sem pLGW); B: pLGW puro; C: complexo MWCNT-CHOO/pLGW e D: complexo PEI/pLGW.

Entretanto, a eficiência de transfecção de NTC pode ser influenciada pelo método de funcionalização dos NTC [8], tamanho e característica do NTC [11] e proporção da quantidade de NTC e DNA. No presente estudo, quando comparada com uma técnica de referência, a menor eficiência de transfecção dos MWNT pode estar associada simultaneamente aos fatores supracitados e, ao uso de fibroblastos bovinos que, sabidamente apresenta menor número de células transfectadas quando comparadas à outros tipos celulares (*e.g.* HEK293).

Portanto, novos estudos estão sendo desenvolvidos, visando o aumento da eficiência de transfecção com MWCNT-CHOO em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

Conclusões

Os MWCNT-CHOO são capazes de transfectar fibroblastos bovinos, porém são necessários mais estudos para o aumento da taxa de transfecção com este nanomaterial.

Agradecimentos

À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES 04/CII-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede AgroNano e ao departamento de Física da UFMG.

Referências

1. G Bardi; P. Tognini; G. Ciofani; V. Raffa; M. Costa; T. Pizzorusso. *Nanomedicine*. 2009, **5**, 96.
 2. L. Lacerda; A. Bianco; M. Prato; K. Kostarelos. *J. Mater. Chem.* 2008, **18**, 17.
 3. M.S. Ladeira; V.A. Andrade; E.R.M. Gomes; C.J. Aguiar; E.R. Moraes; J.S. Soares; E.E. Silva; R.G. Lacerda; L.O. Ladeira; A.Jorio; P. Lima; M.F. Leite; R.R. Resende; S. Guatimosim. *Nanotechnology*. 2010, **21**, 1.
 4. M. Liu; B. Chen; Y. Xue; J. Huang; L. Zhang; S. Huang; Q. Li; Z. Zhang. *Bioconjug. Chem.* 2011, **22**, 2237–2243.
 5. W. Qin; K. Yang; H. Tang; L. Tan; Q. Xie; M. Ma; Y. Zhang; S. Yao. *Colloids. Surf. B Biointerfaces*. 2011, **84**, 206.
 6. A.N. Enyashin; S. Gemming; G. Seifert. *Nanotechnology*. 2007, **18**, 702.
 7. P.N. Yaron; B.D. Holt; P.A. Short; M. Lösche; M.F. Islam; K.N. Dahl. *J. Nanobiotechnology*. 2011, **9**, 1.
 8. M. Ahmed; X. Jiang; Z. Deng; R. Narain. *Bioconjug. Chem.* 2009, **20**, 2017.
 9. D. Cai; J.M. Mataraza; Z.H. Qin; Z. Huang; J. Huang; T.C. Chiles; D. Carnahan; K. Kempa; Z. Ren. *Nat. Methods*. 2005, **2**, 449.
 10. L.G. Delogu; A. Magrini; A. Bergamaschi; N. Rosato; M.I. Dawson; N. Bottini; M. Bottini. *Bioconjug Chem*, 2009, **3**, 427.
 11. K. Yang; W. Qin; H. Tang; L. Tan; Q. Xie; M. Ma; Y. Zhang; S. Yao. *J. Biomed. Mater Res. A*. 2011, **99**, 231.
-