

SILENCIAMENTO GÊNICO EM MICROALGAS MEDIADO POR NANOPARTÍCULAS CARREADORAS DE OLIGONUCLEOTÍDEO ANTISENSE

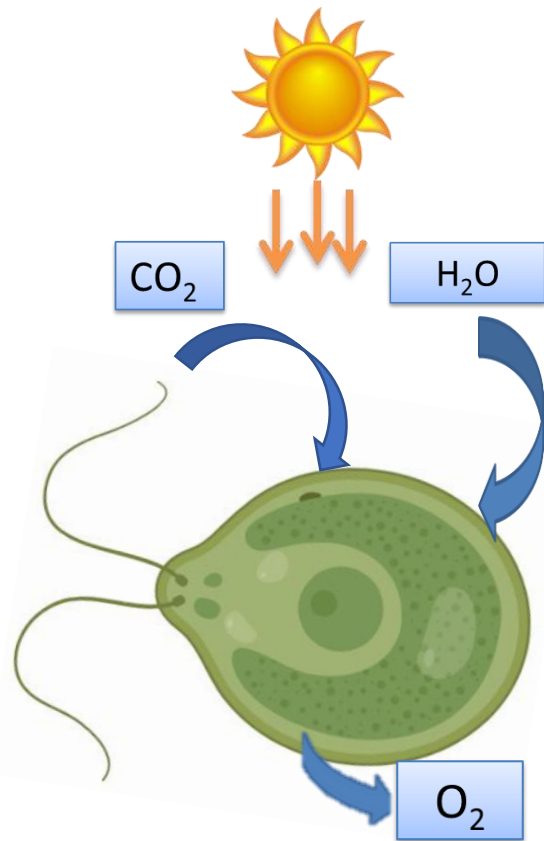
Ivan Alberto Sandoval Salazar
Doutorando em Bioenergia
isandoval@usp.br

Flavia Vischi Winck
Orientadora
winck@cena.usp.br

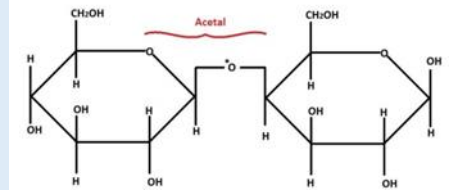
16/11/2022



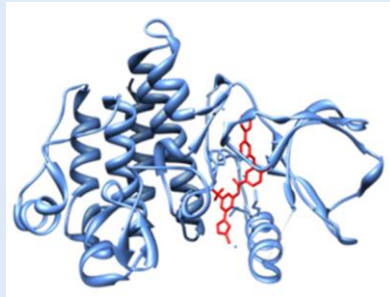
Potencial biotecnológico das microalgas



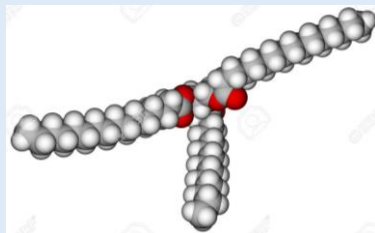
O que são as microalgas??



Carboidratos



Proteínas



Lipídios

Qual é seu potencial biotecnológico??



Pode-se otimizar??

Condições de cultivo

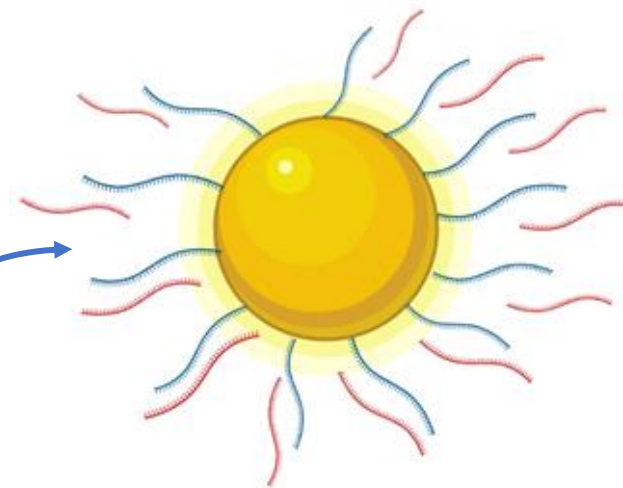
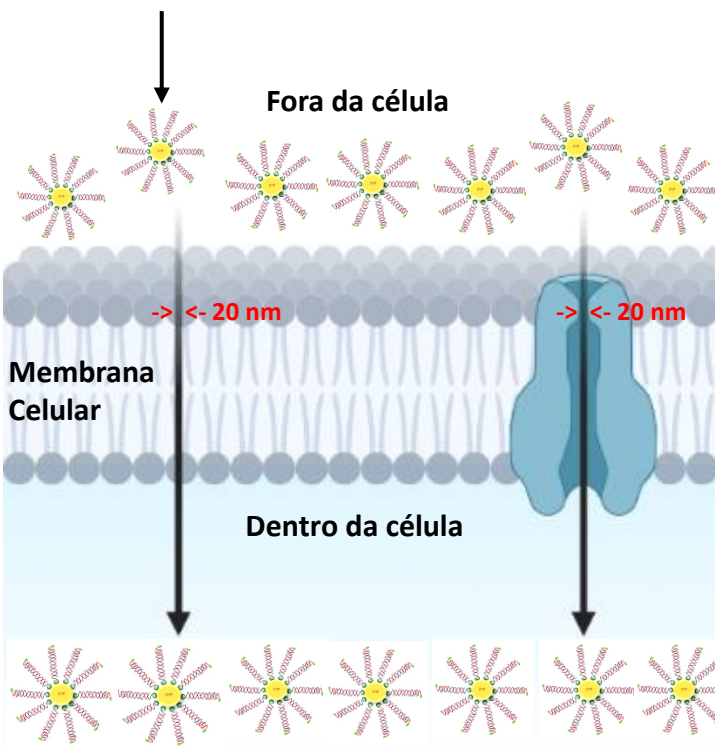
Engenharia genética

Controle da expressão
gênica

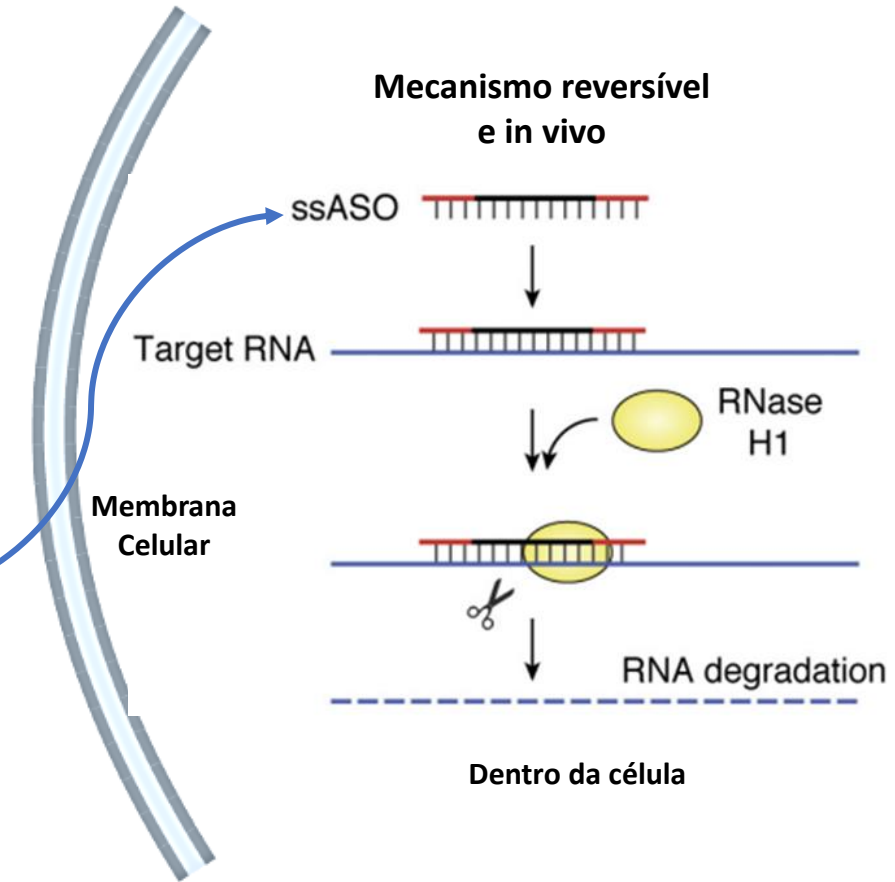
Tratamentos físicos e
químicos

Internalização de nanopartículas de ouro funcionalizadas e mecanismo de silenciamento gênico com oligonucleotídeos de DNA

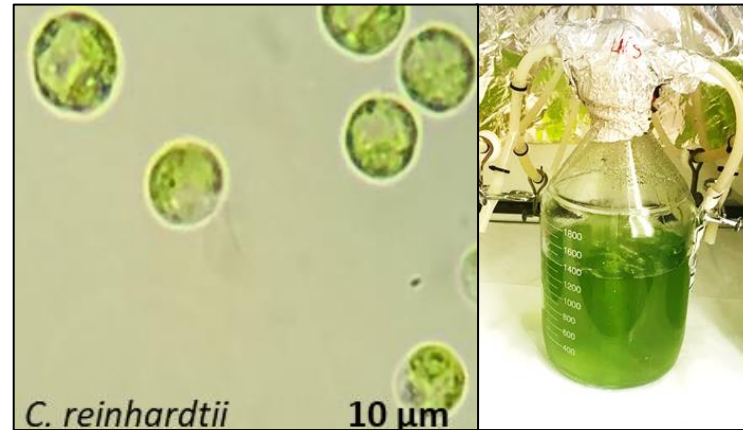
NPs de AuNPs com DNA de dupla fita



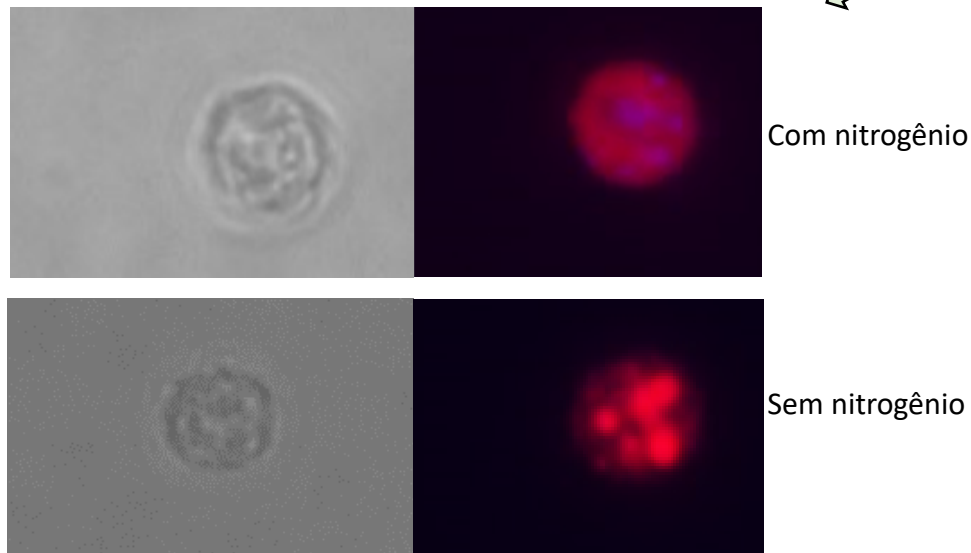
Liberação fototérmica de DNA antisense dentro da célula usando iluminação LED



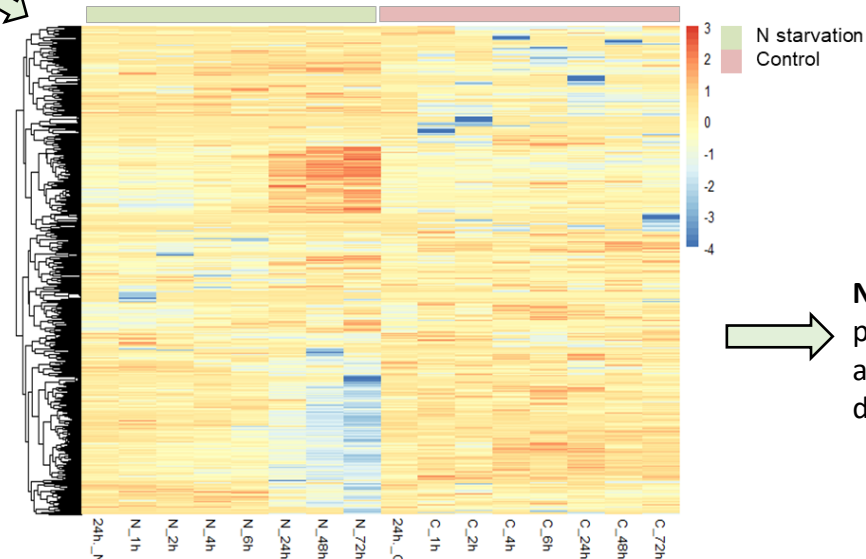
MATERIAL E MÉTODOS



Condições de cultivo
Meio TAP
25 °C
Iluminação de 100 µmols m⁻²s⁻¹
luz contínua



Analises de fluorescência de corpos lipídicos usando Nile Red



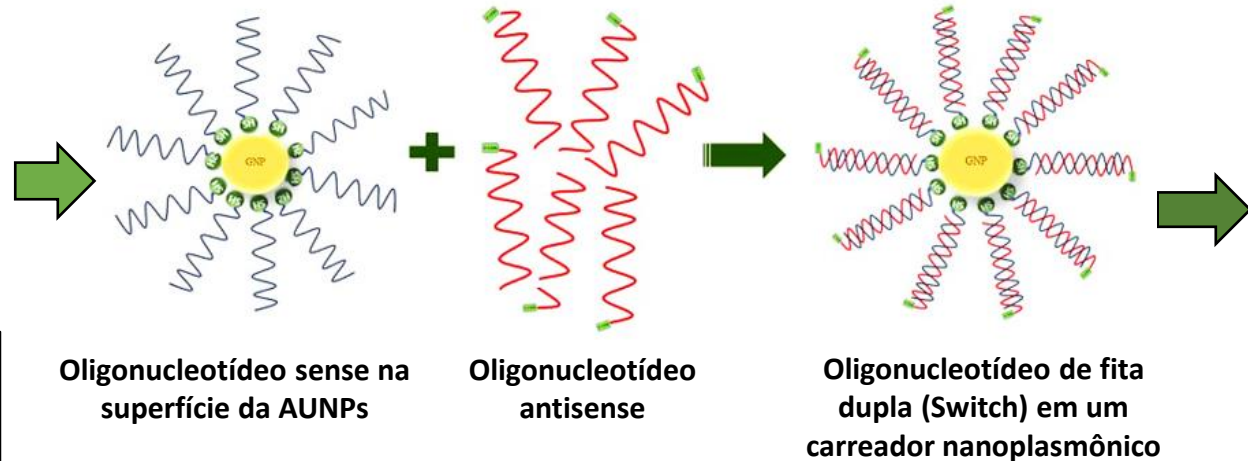
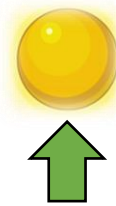
Análise proteômica de *C. reinhardtii* sem fonte de nitrogênio

Gene de interesse

N-Acetilglutamato sintase (NAGS)
participa na produção de ornitina e arginina e esta envolvido na síntese de lipídios

Síntese de AuNPs e conjugação com oligonucleotídeos sense modificados com tiol e oligonucleotídeos antisense marcados com Cy-5 para o gene **N-Acetilglutamato sintase (NAGS)**

Método de redução do citrato (Turkevich *et al.*, 1951), utilizou-se uma solução 0,5 mM de AuCl_3 e uma solução 38,8 mM de citrato de sódio.



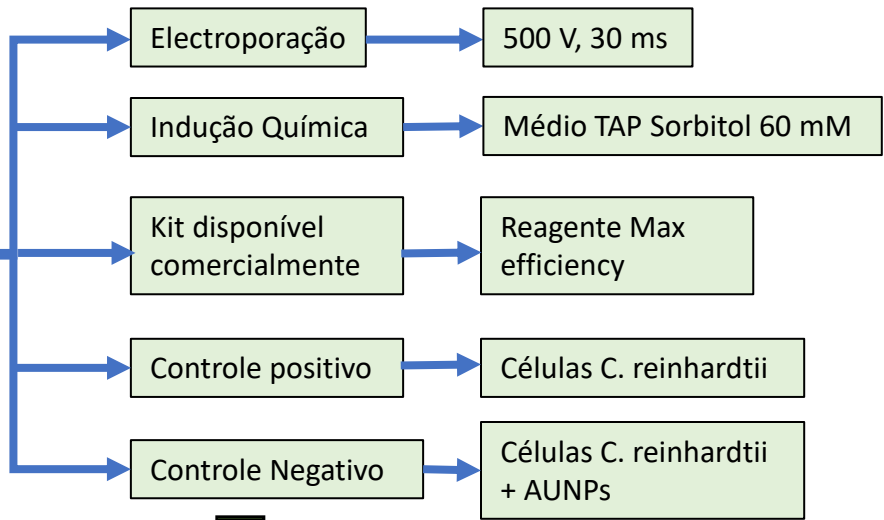
Switch

Avaliação dos métodos de transfecção celular



4,5 x 10⁸ células de *C. Reinhardtii*

Centrifugação 2500 rpm por 5 minutos



Análise da transfecção de AuNPs com DNA de dupla fita mediante fluorescência do fluoróforo CY5

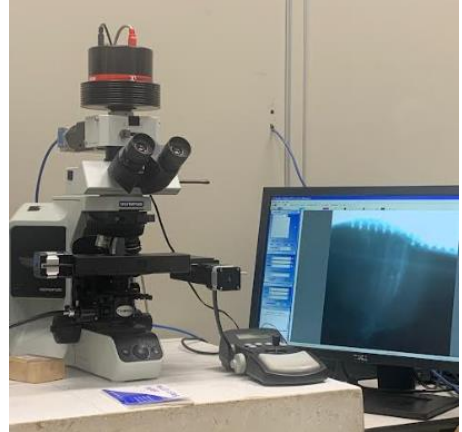


Microscopia confocal
Dye Cy5 - Excitação 648 e Emissão 668



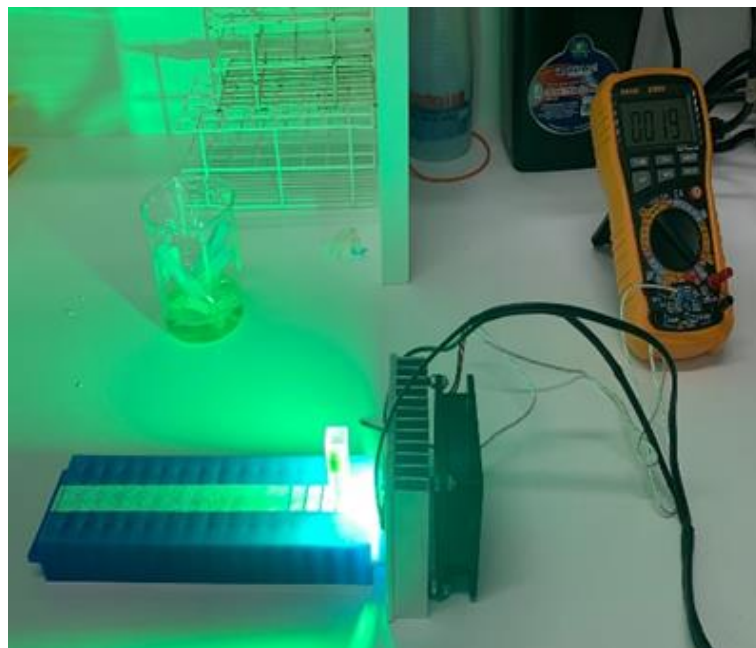
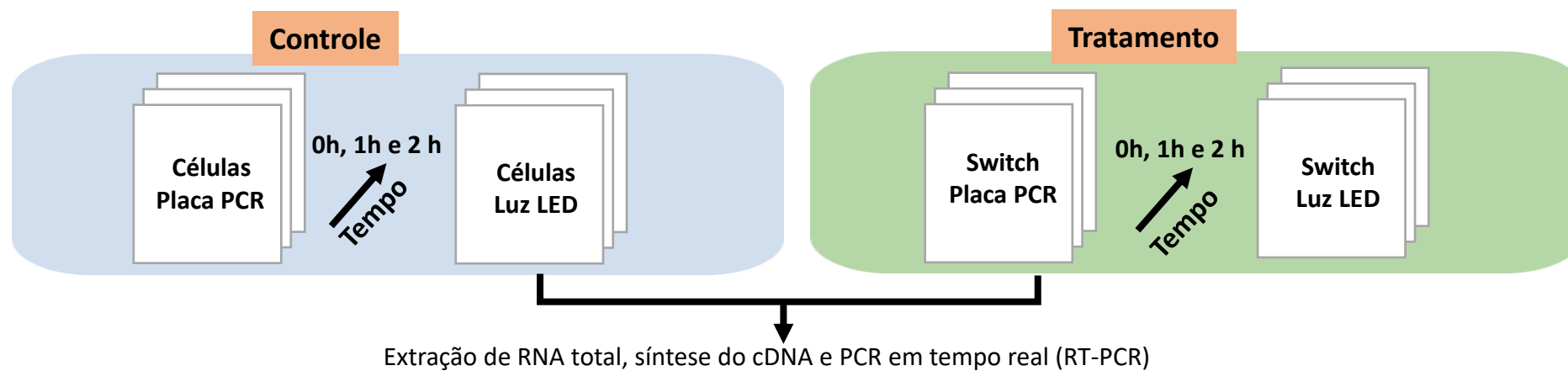
Overnight 12h

Análise da internalização de AuNPs com DNA de dupla fita mediante espalhamento da luz



Microscopia – Cytoviva

Análise de silenciamento gênico



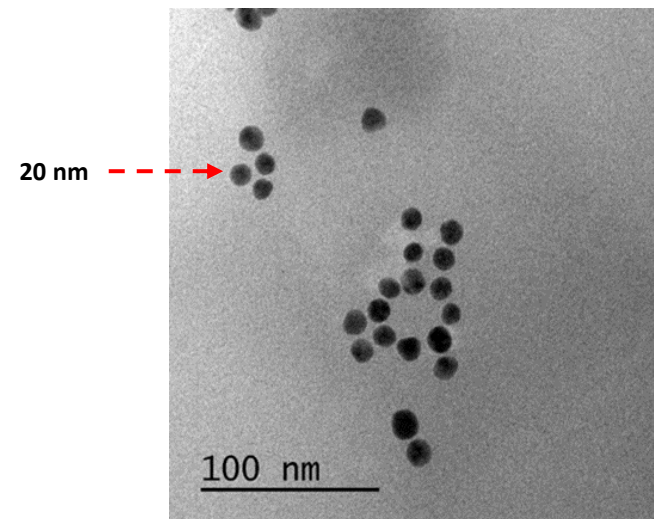
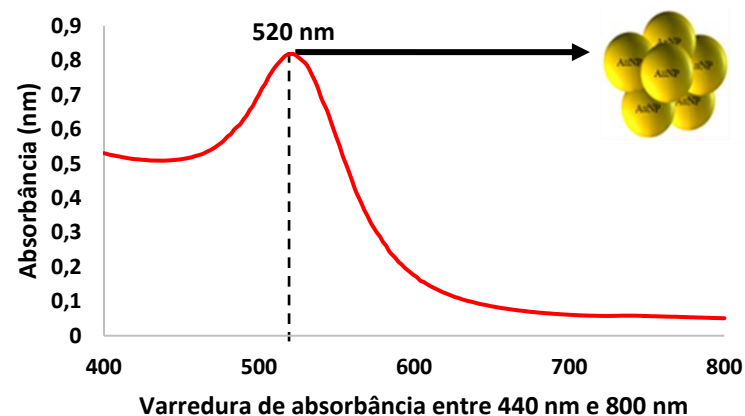
Sistema fototérmico para liberação intracelular dos oligonucleotídeos antisense



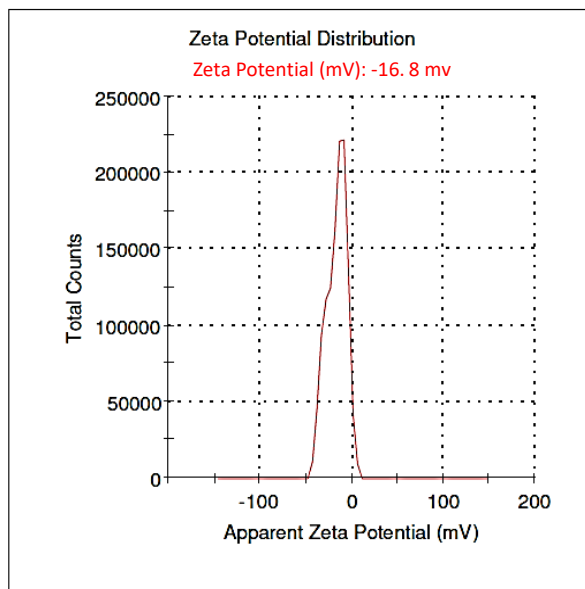
Sistema térmico para liberação intracelular dos oligonucleotídeos antisense

RESULTADOS E DISCUSSÃO

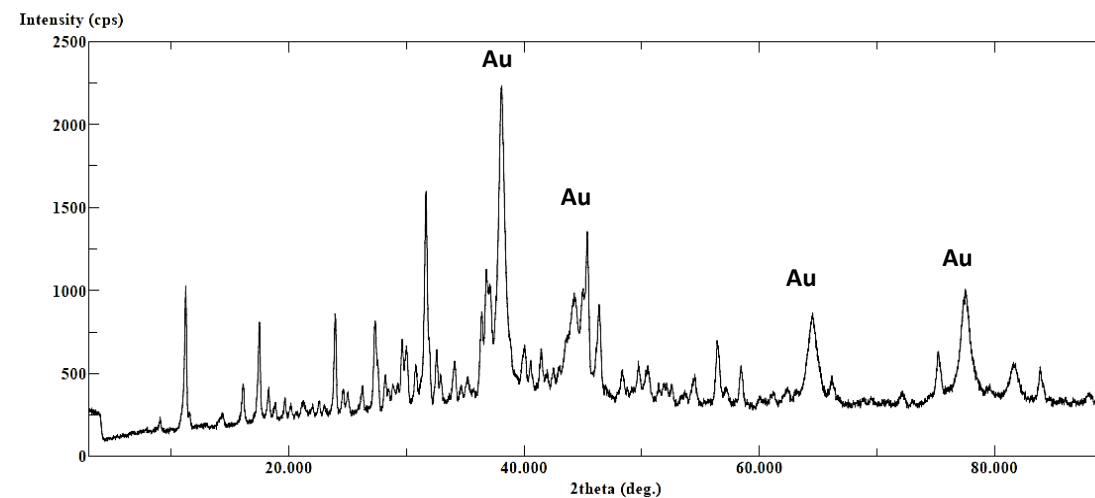
Caracterizações da síntese de nanopartículas de ouro



Análise de microscopia eletrônica de transmissão de AuNPs

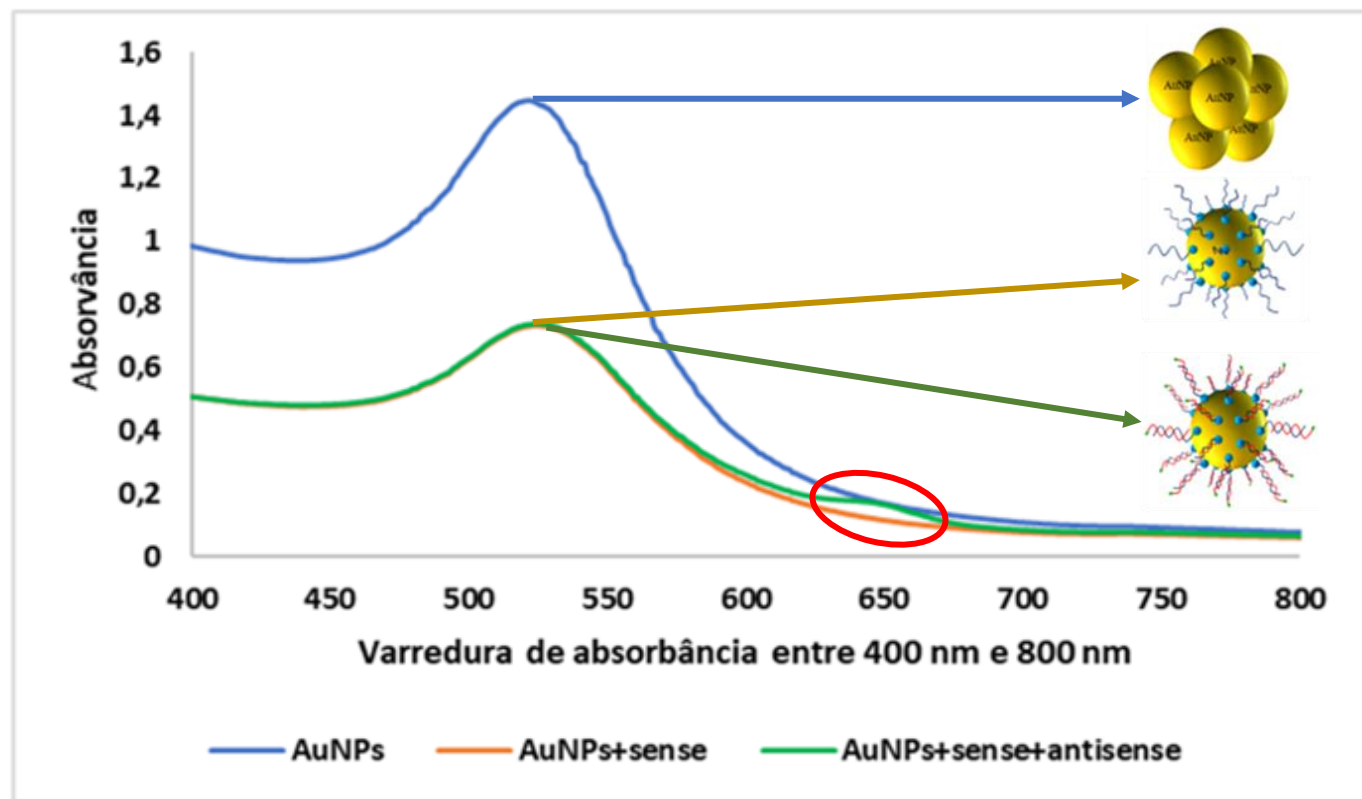


Análise de Zeta potencial de AuNPs

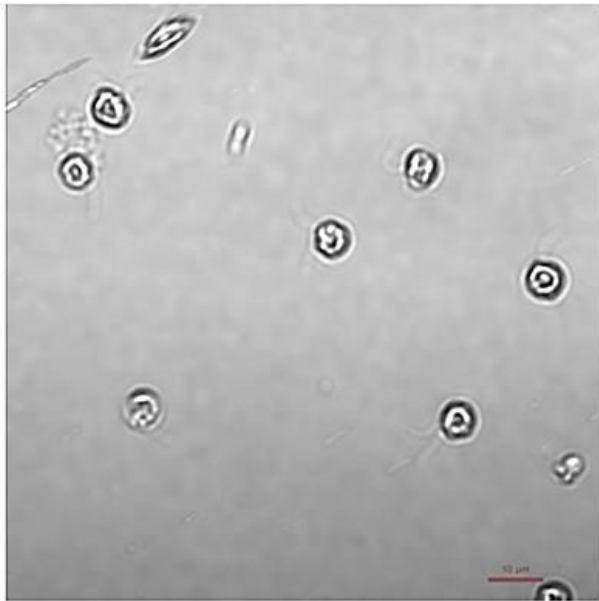


Análise de difração de raios-X de AuNPs

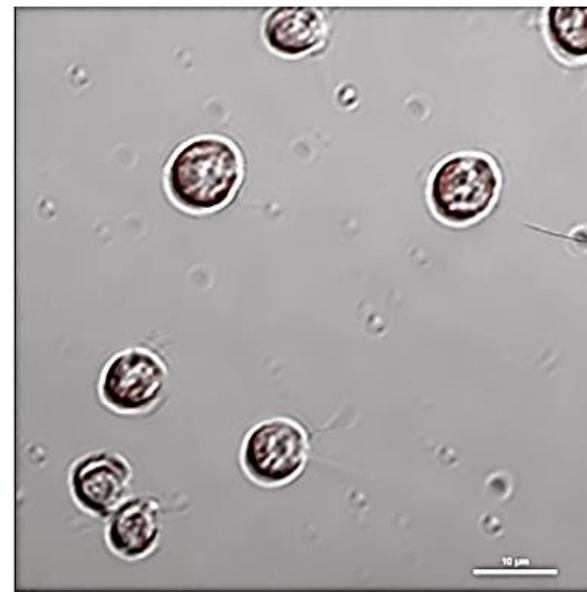
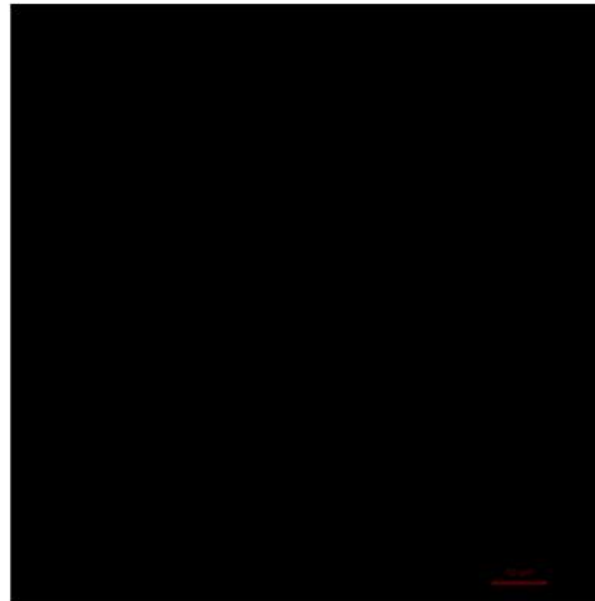
Análise de varredura de absorvância da funcionalização das nanopartículas de ouro com os oligonucleotídeos de DNA (Sense e Antisense)



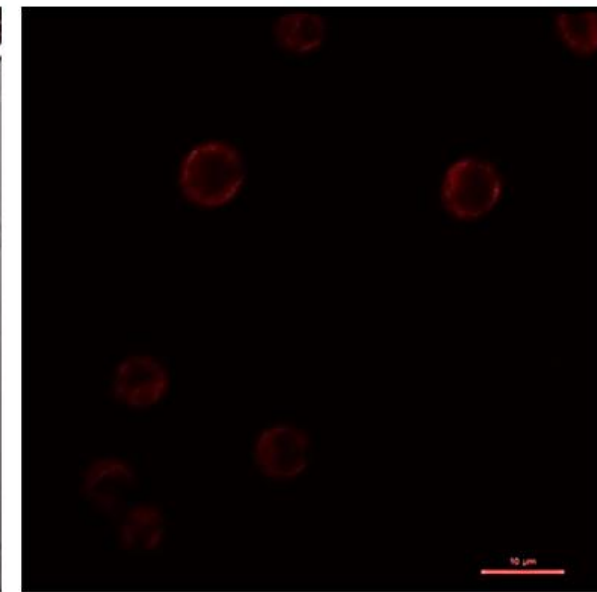
Analise de microscopia confocal: Dye Cy5 - Excitação 648 e Emissão 668

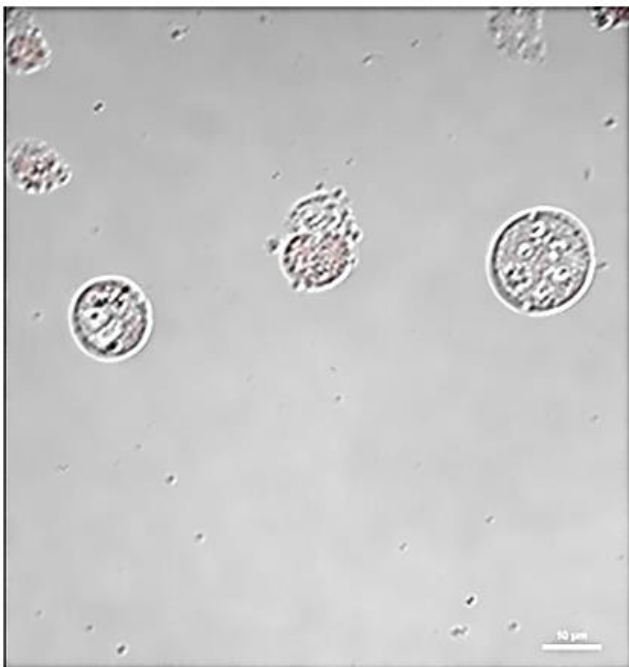


Controle negativo - células

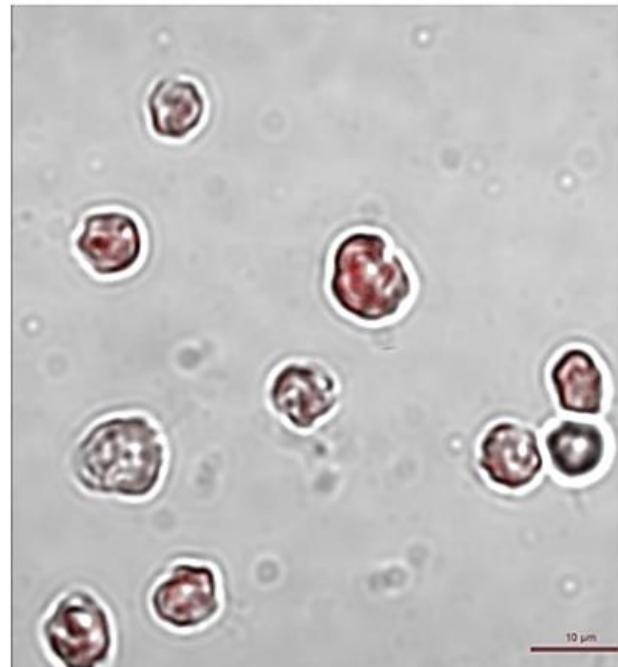


Controle positivo células + AuNPs

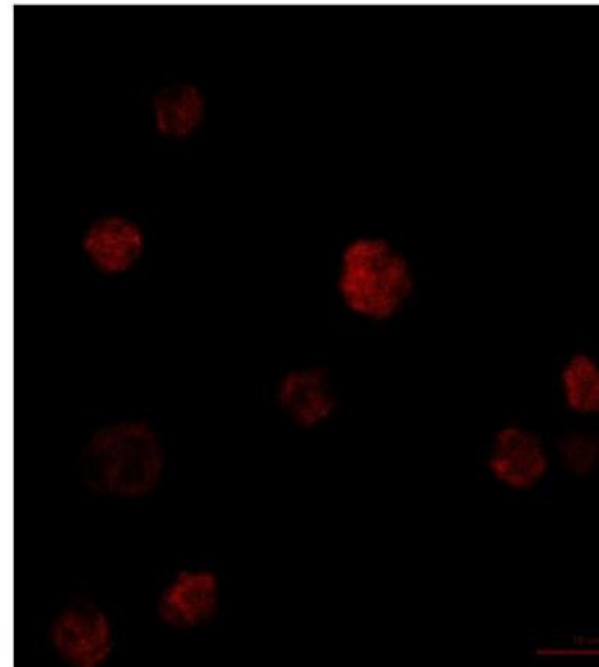


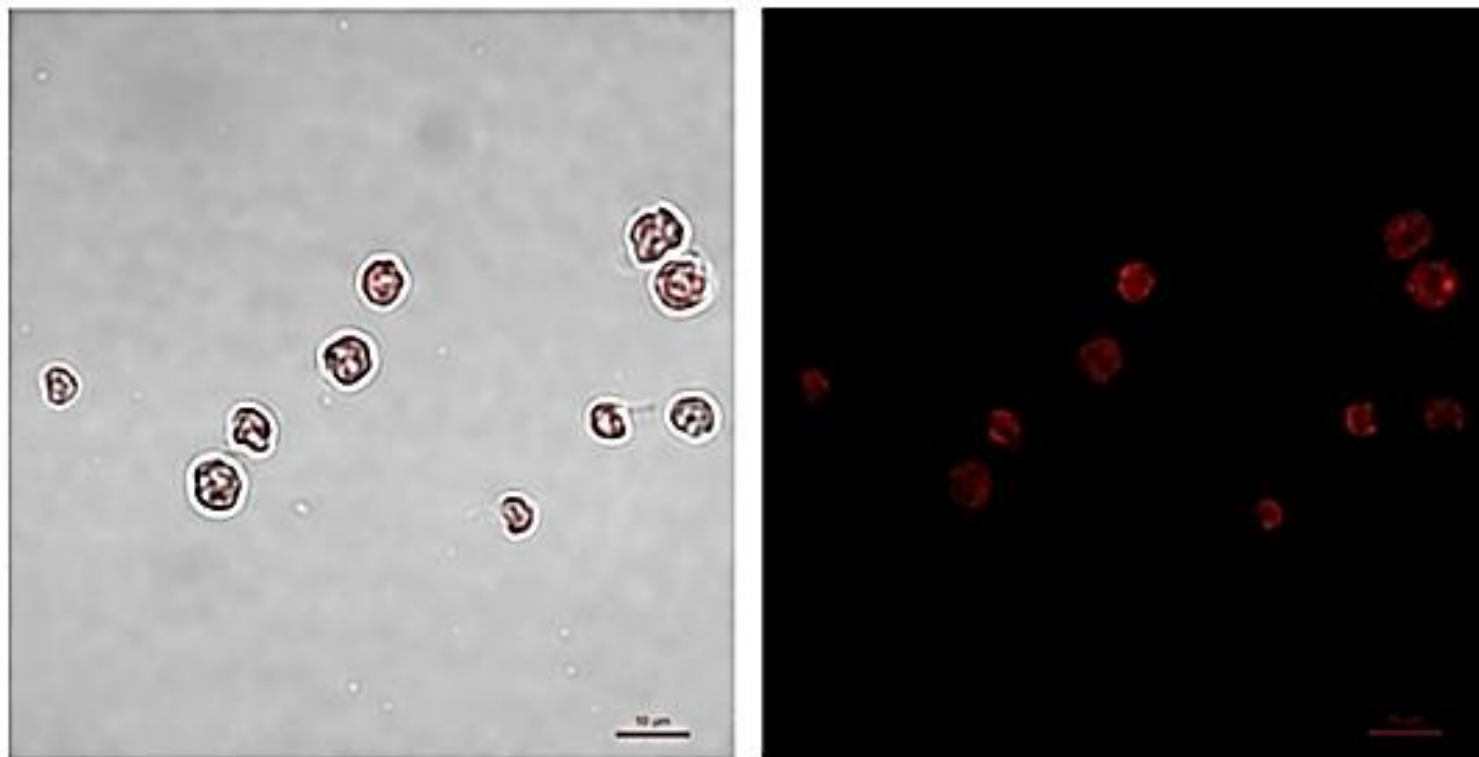


Electroporação - Células + OAS-AuNPs



**Kit disponível comercialmente - Reativo Max Efficiency
Células + OAS-AuNPs**





Indução química - Médio TAP Sorbitol 60 mM - Células + OAS-AuNPs

Analise da imagem óptica de espalhamento de luz no equipamento Cytoviva

Nanopartículas de ouro

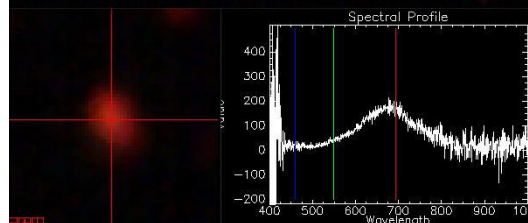
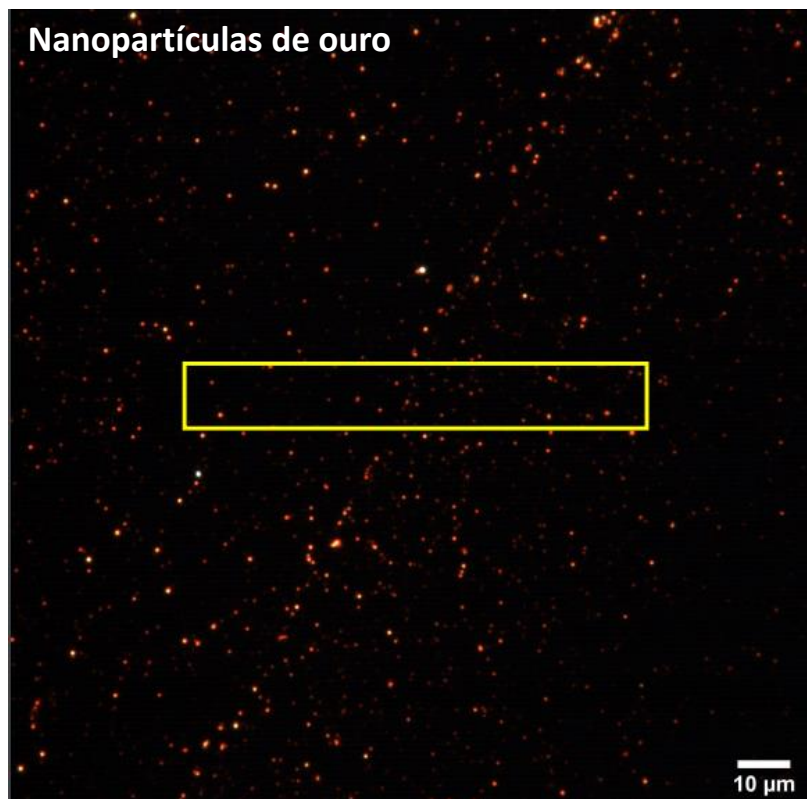


Imagem hiperespectral de espalhamento de luz
Objetiva 100X

Nanopartículas de ouro + Oligonucleotídeos

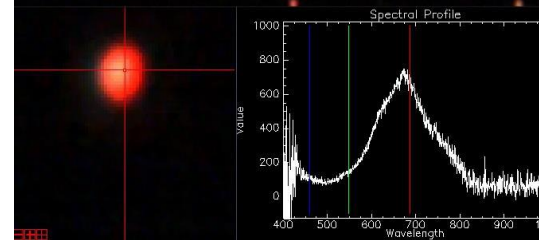
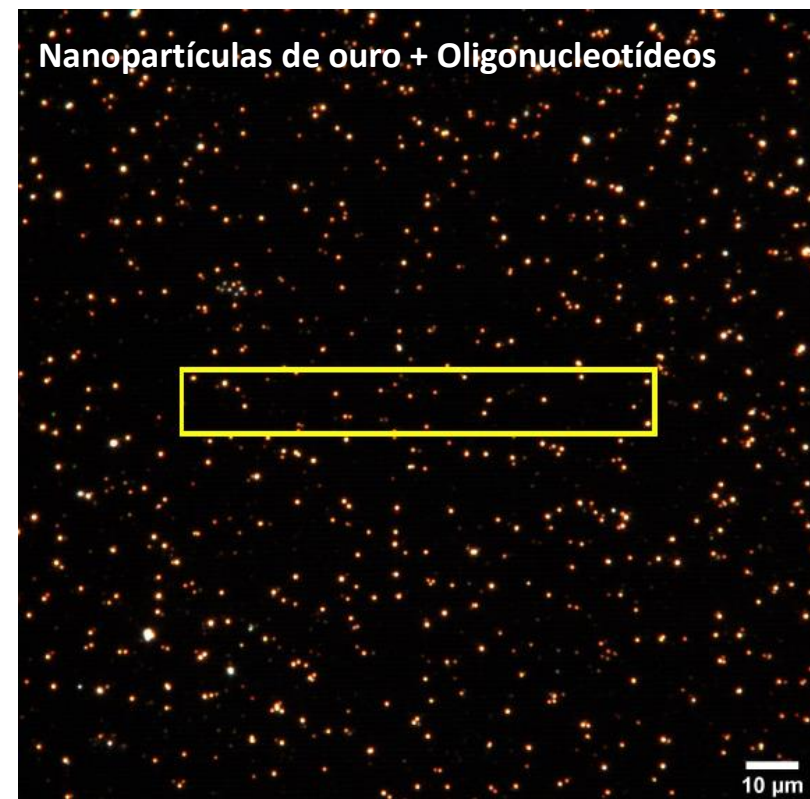


Imagem hiperespectral de espalhamento de luz
Objetiva 100X

Células com AuNPs + DNA dupla fita (switch)

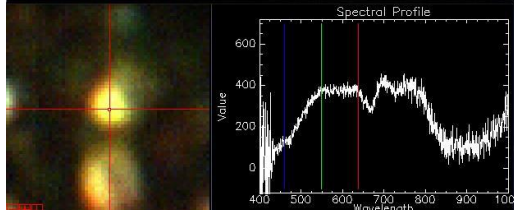
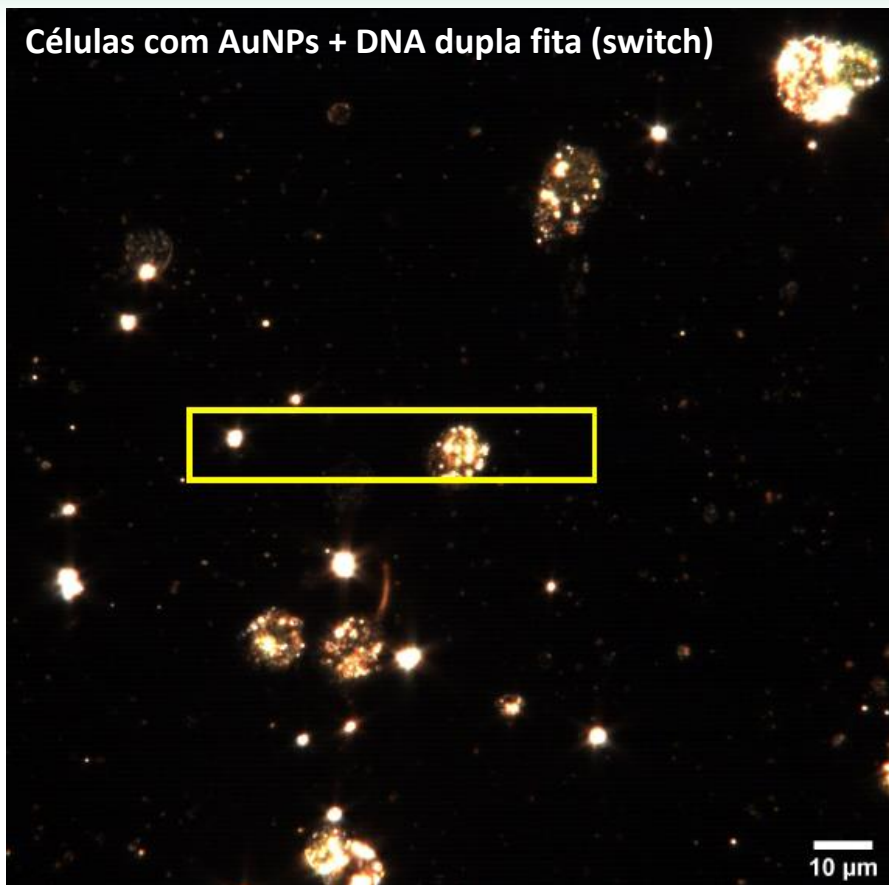


Imagem hiperespectral de espalhamento de luz
Objetiva 100X

Células (Controle)

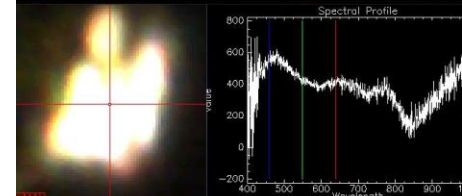
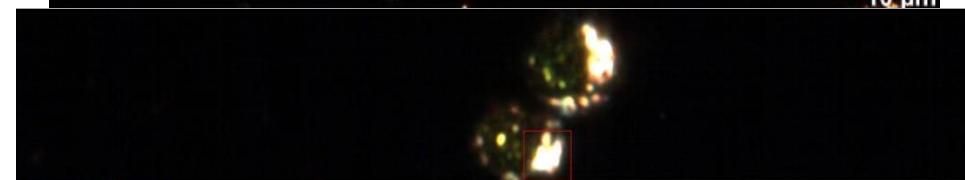
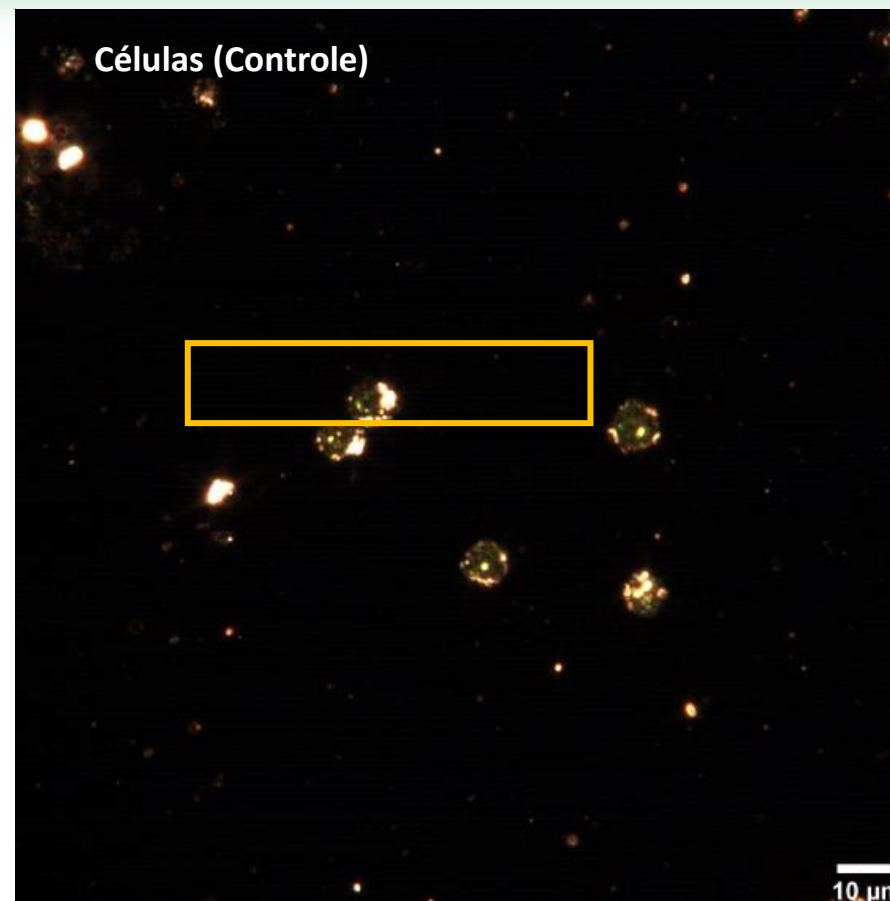
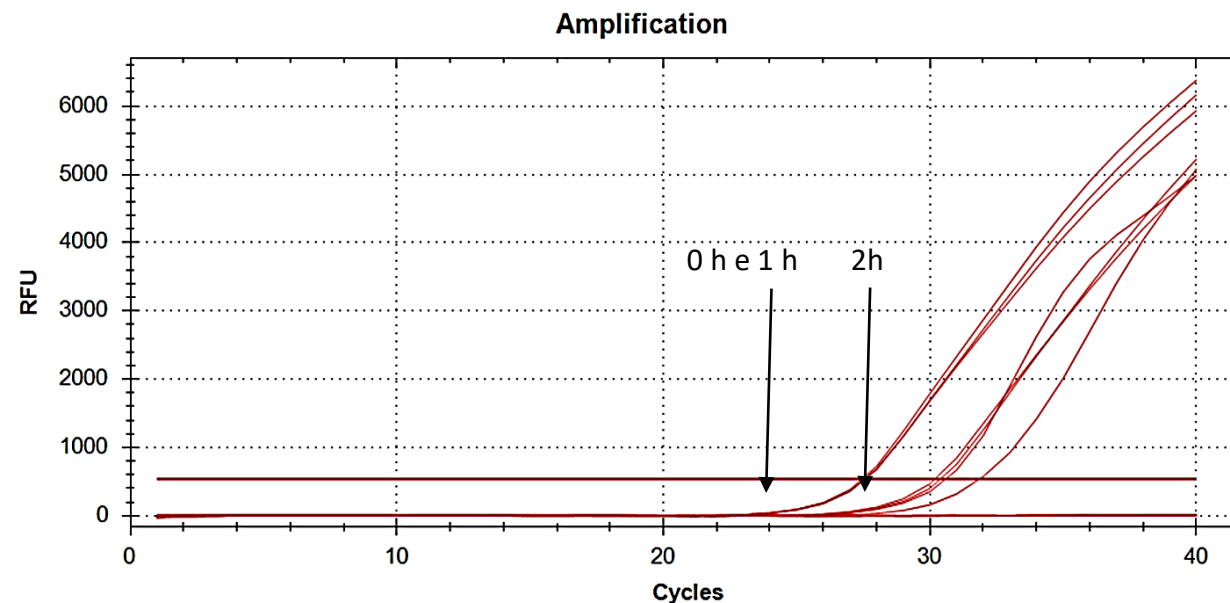


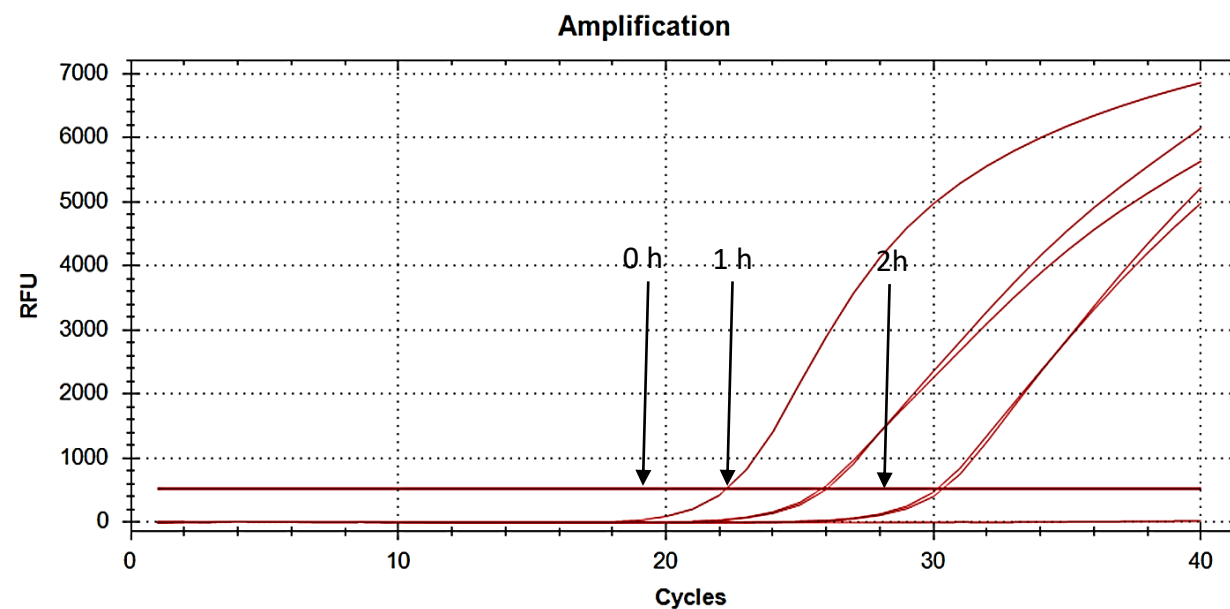
Imagem hiperespectral de espalhamento de luz
Objetiva 100X

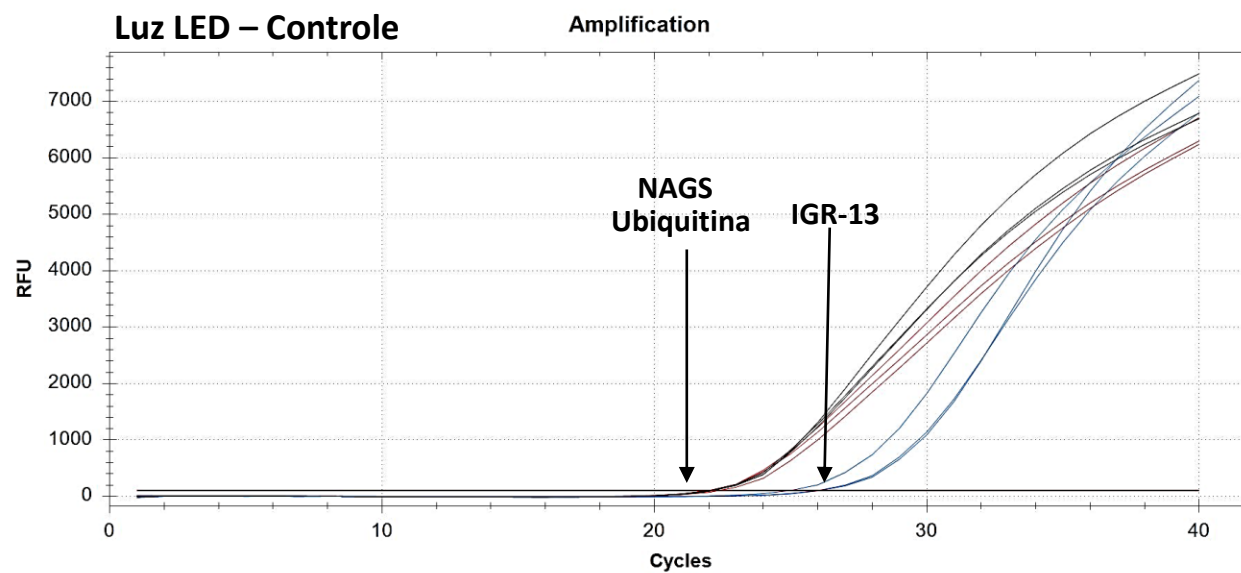
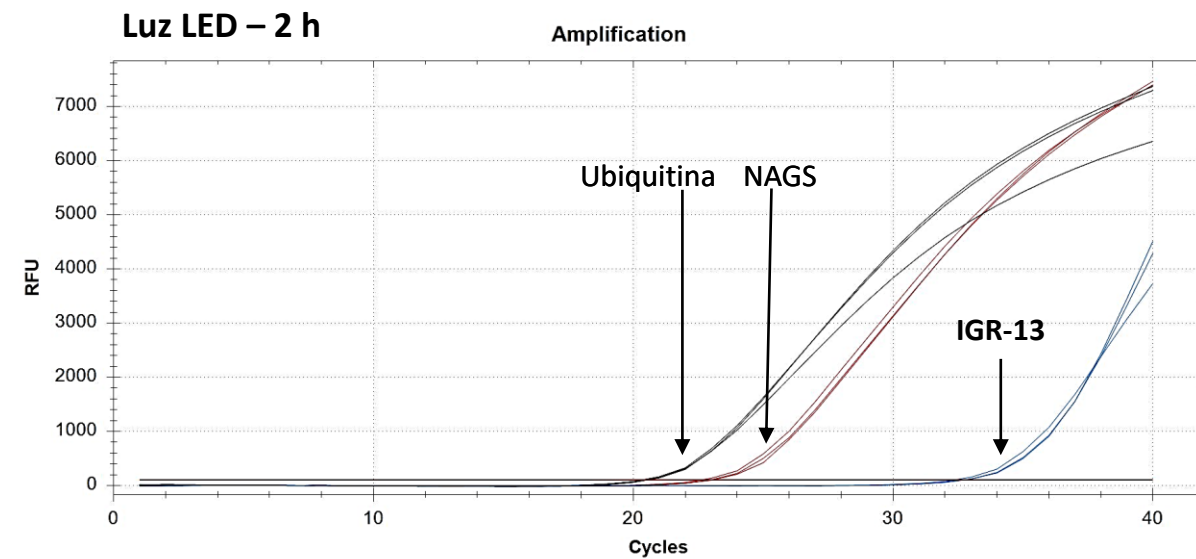
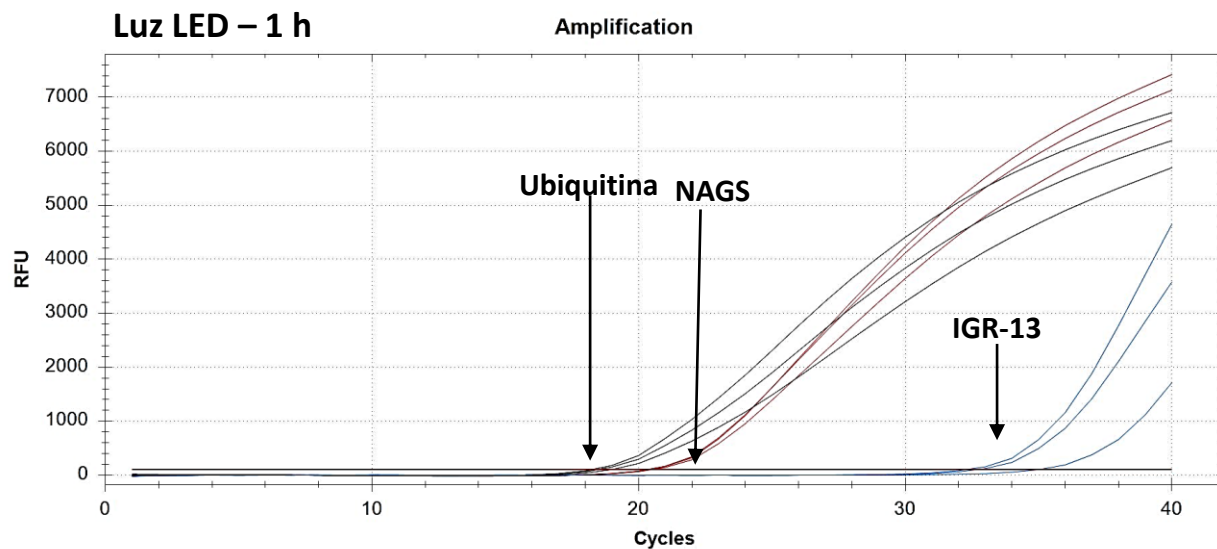
Analises das curvas de amplificação em relação ao número do ciclo de PCR

Células com switch
Placa da PCR
Gene NAGS



Células com switch
Luz LED
Gene NAGS





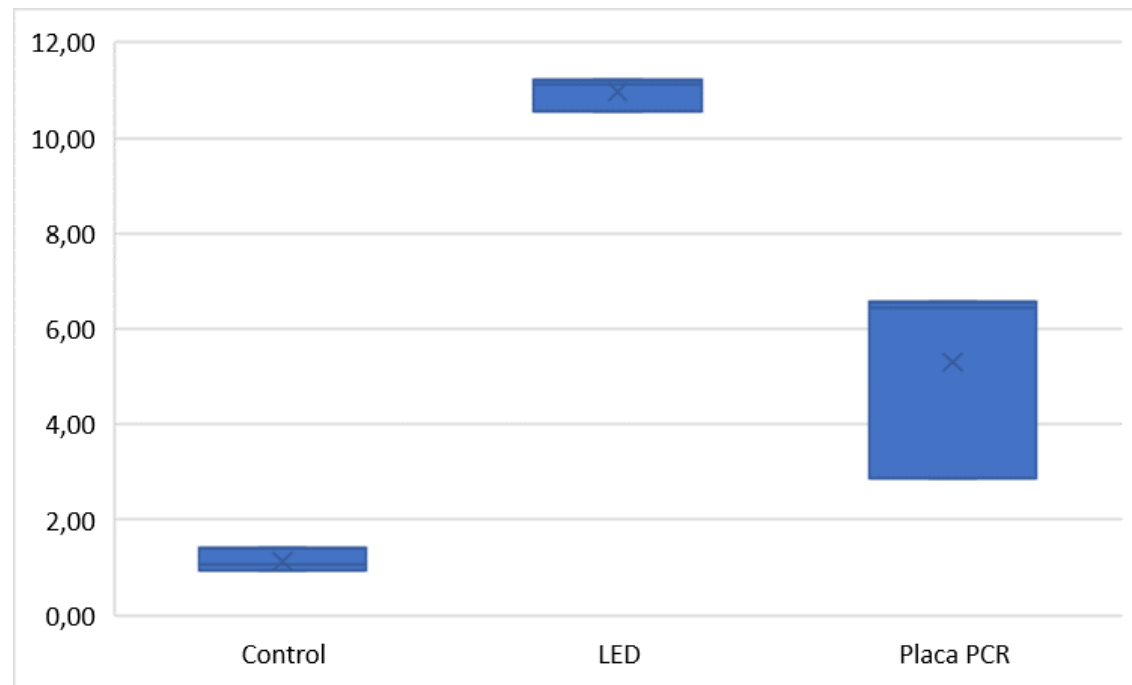


Gráfico Boxplot de Fold Change em 2 h

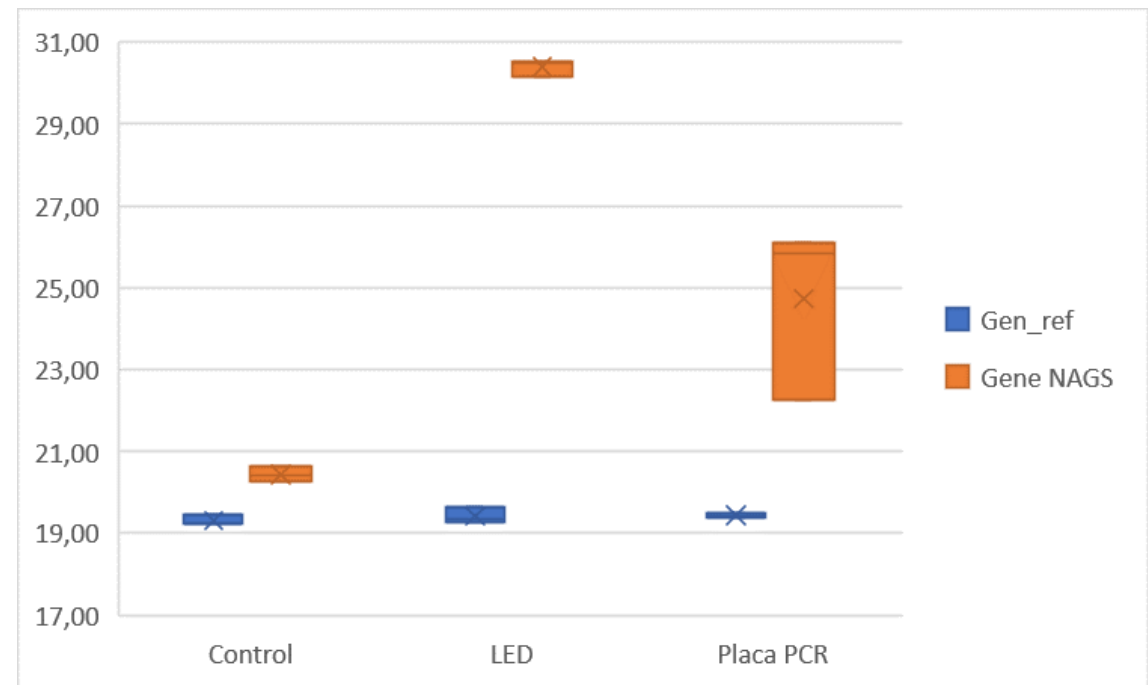
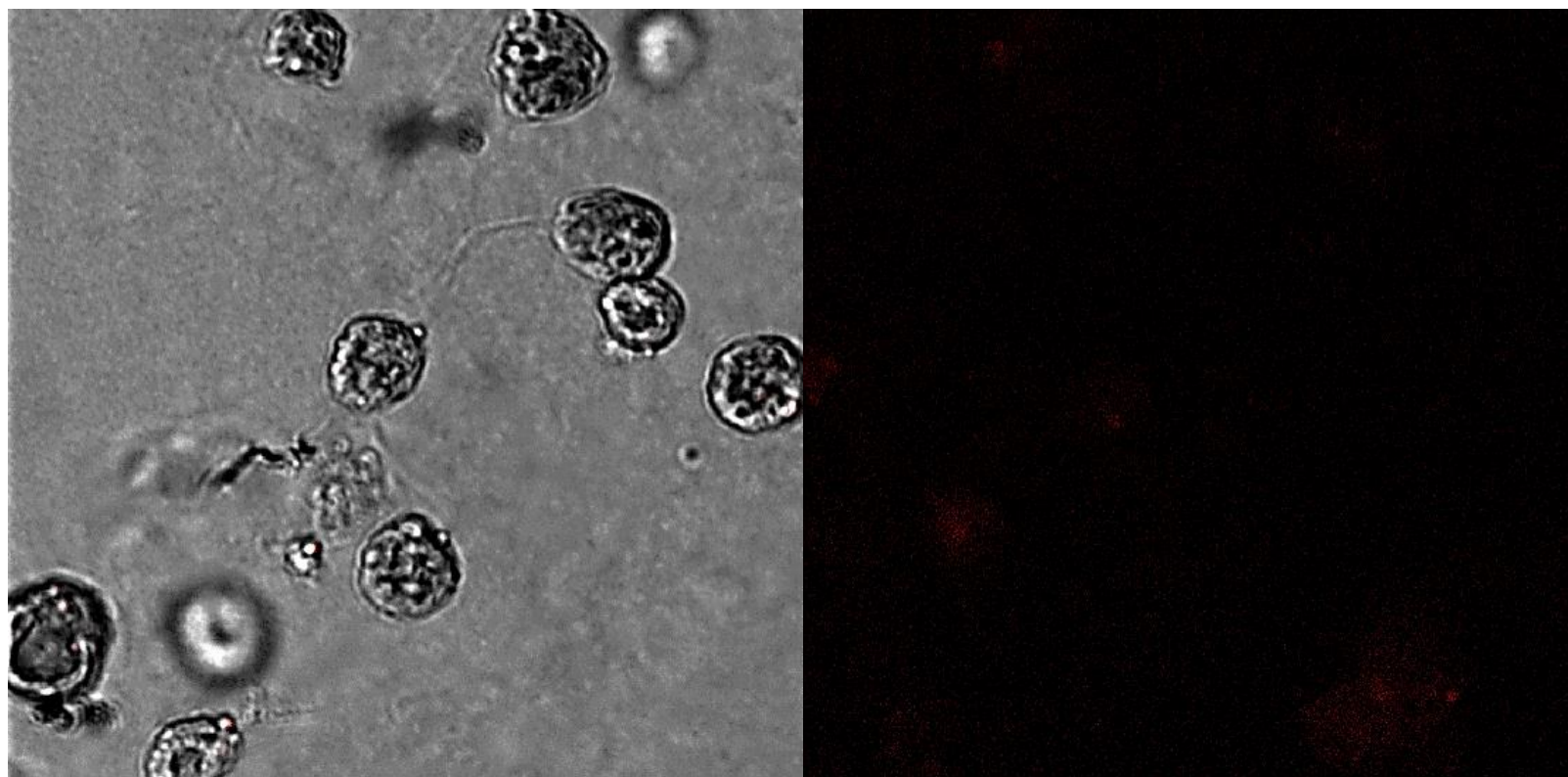


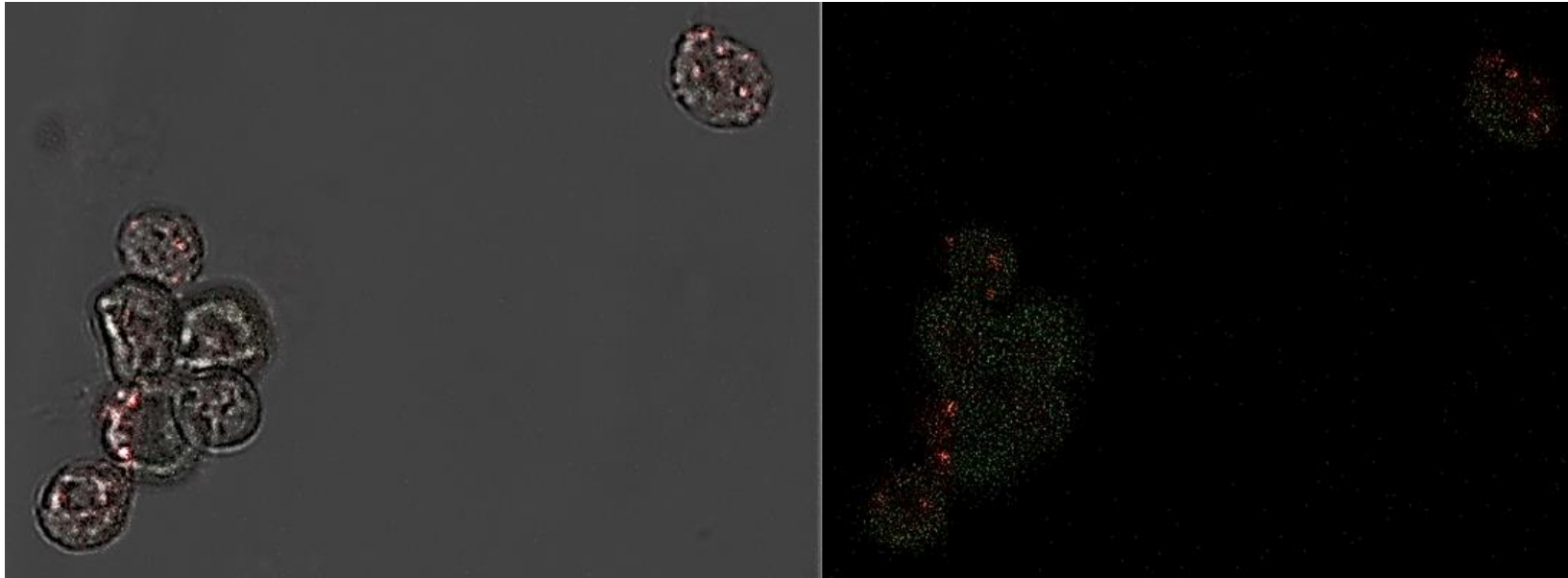
Gráfico Boxplot de CT em 2h

Analises de fluorescência de corpos lipídicos pelo método de Nile Red após 2 h de liberação de oligonucleotídeo antisense (Excitação: 480 nm - Emissão: 580 nm)

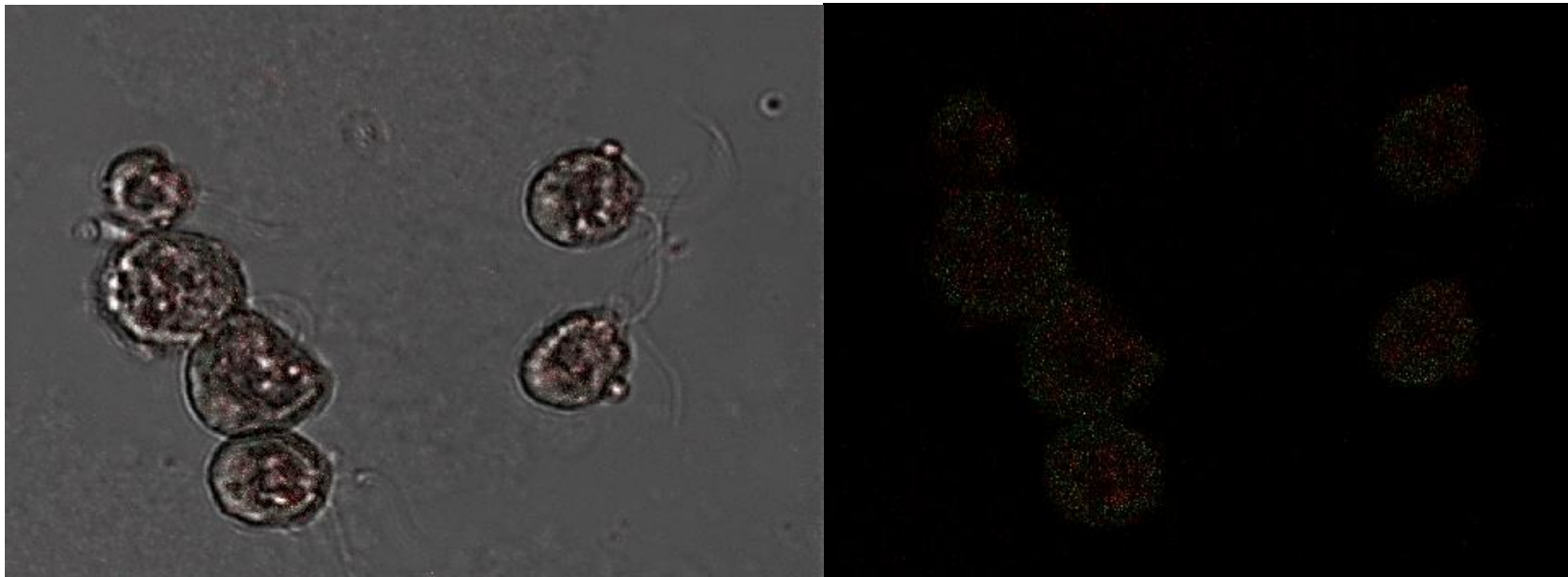


Controle

Luz LED 2 h



Placa PCR 2 h



AGRADECIMENTOS

LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DE SISTEMAS REGULATORIOS

Professora Flavia Winck

Nahid Rafei

Hossein Aratboni



LABORATÓRIO DE QUÍMICA SUPRAMOLECULAR E NANOTECNOLOGIA (IQ-USP)

Professor Koiti Araki

Artur Luis hennemann

Marcelo Nakamura



LABORATÓRIO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS (CENA-USP)

Professor Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Felippe Buck Campana



ESALQ

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo

LABORATORIO ESPECIAL CENTD – INSTITUTO BUTANTAN - USP

Marcelo Medina De Souza



CENTRAL ANALITICA – INSTITUTO DE QUIMICA - USP

FAPESP

Processo 2016/06601-4

Processe 2022/02790-8



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA
DO ESTADO DE SÃO PAULO

CAPES

Processo 88887.702072/2022-00

