

Abstract

Gene therapy is a revolutionary technique that consists in direct manipulation of the individual genetic material. DNA vaccines are based on the insertion of bacterial plasmids that are designed to express a gene into a host cell.

Plasmid DNA has been used for a long time in molecular biology as a convenient mean for genetically modified living organisms. Typically amounts of DNA are needed in such operations and the methodology developed for producing and purifying the plasmid DNA has been developed accordingly. This is especially important in the safer, but less efficient non-viral gene therapy, where large amounts of plasmid DNA are required.

Plasmid DNA intended for use in humans should essentially be free of genomic DNA, RNA, endotoxins, and proteins from the host cell, but also from adventitious agents such as bacteria and fungi. In addition, the plasmid vector should preferably be in the supercoiled topoisomeric form, which is a more effective transfection agent than the open-circular, linear, multimeric, or partially denatured isoforms.

One very important step in any plasmid production process, after fermentation/cell harvest, is cell lysis. During this step the bacteria are broken up and intracellular components are released. Lysis is, therefore, crucial to the production as it determines both the amount of bacterial plasmid DNA actually entering the downstream process and the difficulty of the subsequent purification via the complexity of the feed matrix, i.e., the amount and type of co-released impurities.

The selection of the cell lysis process, among the many that exist, depends on the purpose and type of microorganism to which it will be applied.

The cell lysis processes, particularly the chemical and enzymatic, have been developed to minimize possible adverse effects that could occur to pDNA. In this work 5 different types of reported methods (Alkaline Lysis, Osmotic shock Lysis, Non Enzymatic Thermal Shock, Electrical Cell Lysis and non Alkaline) as well as a newly developed process of plasmid recovery were studied and compared in terms of their profitability.

Key words: Gene Therapy, Plasmid DNA, Cell Lysis.

1 - Introdução

1.1 - Terapia génica

George Mendel foi um monge Austríaco que, por experiências várias, confirmou a existência de características que eram herdadas de indivíduo para indivíduo.

Desde esse tempo, muitas descobertas demonstraram a função de manutenção e regulação do organismo por parte dos genes.

A maior saliência destas descobertas é relativo a doenças de ordem genética, ou seja, doenças associadas a erros genéticos. A partir deste princípio, facilmente se ascendeu à ideia da utilização de terapias com o intuito de usar o gene como agente ou alvo terapêutico. Assim surge a terapia génica (TG), a próxima grande revolução da medicina moderna. A terapia génica é a mais nova arma da medicina no combate a doenças genéticas. Esta técnica revolucionária consiste na modificação e manipulação directa do material genético do indivíduo afectado, de modo a promover a correcção da anomalia genética causadora da doença.

Partindo do conceito de que doenças genéticas nada mais são do que produtos codificados a partir de um ou mais genes defeituosos, a terapia génica introduz, através de vectores, os genes desejados no genoma do paciente. Esses genes transferidos podem ser versões normais dos genes defeituosos do indivíduo, que serão substituídos no processo de transfecção, ou genes que codificam para determinadas moléculas que terão importante papel na cura da doença.

Deste modo, a terapia génica trata directa e especificamente a causa da doença, diferenciando-se do tratamento convencional, ao mesmo tempo em que reduz ao mínimo os efeitos colaterais.

Os avanços significativos da genética humana nas últimas décadas propiciaram um grande impacto na medicina clínica. O conhecimento da intimidade dos 46 cromossomas humanos e dos genes, estruturas complexas que carregam todo o conjunto de informações que particularizam cada indivíduo, faz da genética um ponto fulcral da maioria das doenças.

Mais de 10.000 fenótipos variantes, de origem genética, são hoje conhecidos sendo na sua maioria doenças incuráveis. Com o advento das novas tecnologias, em particular, na área da biologia molecular, a aplicação clínica da terapia génica tem vindo a tornar-se numa possibilidade real de cura dessas doenças (Penque, 2000).

As vacinas na terapia génica podem também promover imunidade contra uma grande maioria de doenças letais provocada por vírus, tal como a tuberculose (Prazeres *et al.*, 1999).

Para a SIDA, este tipo de vacina tem como objectivo conferir imunidade contra a transmissão do vírus HIV-1.

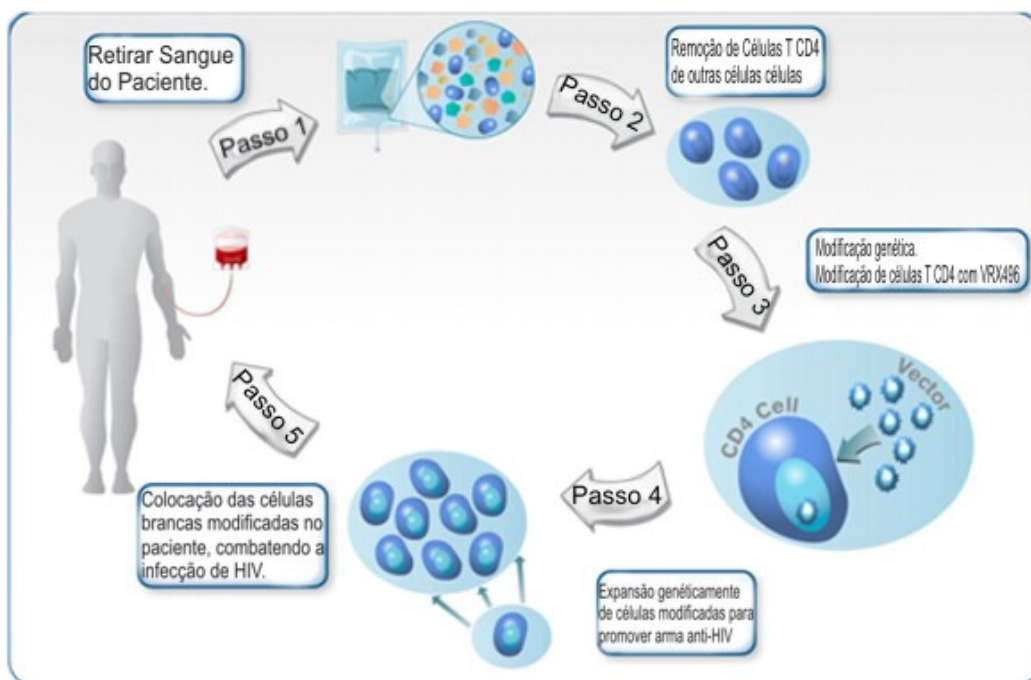


Figura 1 – Processo esquemático global da aplicação da terapia génica no caso do vírus HIV. Adaptado de VirxSys.net

Outros programas de investigação têm também vindo a considerar o desenvolvimento terapêutico ou preventivo de vacinas contra a malária, tuberculose e aos vírus da hepatite A, B e C, *Influenza*, *La Crosse* e *Ébola*. São, portanto, várias as aplicações terapêuticas da tecnologia de transferência génica.

Contudo, a sua eficácia no combate às doenças permanece ainda questionável (Penque, 2000). Os primeiros ensaios clínicos realizados a partir de 1990 até 1995, chamaram a atenção dos *media*. Foram desenvolvidos vários tipos de aplicação da terapia génica, viral e não viral, e todas as hipóteses foram testadas em tratamentos de cancro, e outras doenças. Em 1995, foi tornado claro que a expectativa clínica desta

terapia tinha sido colocada demasiado elevada e muito prematura. No decorrer do ano 1999, Jesse Gelsinger foi o primeiro paciente a morrer com este tipo de tratamento nos Estados Unidos da América, com um tratamento com retrovírus. Os primeiros resultados pareciam ser muito positivos, mas posteriormente muitas complicações surgiram por infecções secundárias. (Debyser, 2003).

O Projecto Genoma, que visa sequenciar e mapear todos os genes, avança a passos largos e o impacto transfere-se também para a possibilidade de tratamento e correcção das alterações genéticas. Através da introdução no corpo humano de material genético artificial, obtido com o auxílio da biotecnologia, procura-se modificar uma anomalia genética responsável por uma anomalia física ou doença de causa genética. No entanto, apesar desta evolução assustadora, observada e constatada nas comunicações científicas especializadas, a implantação, sistematização e uso corrente do tratamento das doenças genéticas pela terapia génica ainda está longe de se aplicar.

Parece aceitável pensar que, para a terapia génica, como para qualquer terapia, haverá sempre um grau de risco associado e que este estará dependente da doença em causa e dos métodos utilizados, bem como do estado geral e clínico do paciente.

Contudo, o sucesso da aplicação da terapia génica com segurança e sobretudo com eficácia na prevenção e no combate às doenças, dependerá essencialmente do aprofundar dos conhecimentos básicos da biologia molecular e da fisiopatologia das doenças bem como do desenvolvimento de metodologias eficientes de transferência génica.

Neste momento, pode-se apenas considerar que a terapia génica é ainda um objectivo a alcançar mais do que uma realidade em que a sua aplicação sem riscos, como qualquer terapia convencional, tenha uma vantagem acrescida de aliviar ou curar em definitivo a doença em causa.

Terapia génica e vacinas genéticas prometem, então, ser uma revolução no tratamento de doenças adquiridas tal como hereditárias

1.2 - Conceito e Princípio de Terapia Génica

O conceito de terapia génica é aplicado a qualquer tipo de intervenção de ordem terapêutica em que sequências nucleotídicas são propositadamente introduzidas ou modificadas em células de tecidos humanos.

Num processo celular em que as sequências nucleotídicas estão alteradas, os produtos da sua transcrição desenvolvem funções biológicas anormais, originando desordens genéticas. A terapia génica corresponde à introdução de material genético nas células com o pressuposto de curar uma doença (Debyser, 2003), introduzindo um ou mais genes funcionais de forma a prevenir, tratar e curar os defeitos genéticos (Prazeres *et al.*1999).

A chave do sucesso da terapia génica é a entrega do gene correcto para as células que dele necessitam. Em geral, as sequências nucleotídicas introduzidas são moléculas de cDNA de genes normais que irão repor a funcionalidade de genes correspondentes que se encontram mutados nas células/tecidos a serem tratados.

Condições ou desordens que surgem de mutações num único gene são os melhores candidatos para terapia génica.

Este tipo de estratégia tem sido utilizado para as doenças monogénicas tais como a fibrose quística, hemofilia e muitas outras (Penque, 2000).

Num outro tipo de Terapia Genica, a utilização de genes suicidas, em vez da correcção genética da desordem, pode ser útil em doenças como cancro ou outras. Ou seja, genes que, ao serem expressos, levam á morte da célula, como são o caso do gene da enzima cinase da timidina (*tk*) do vírus do herpes. Esta enzima tem a particularidade de converter a droga *ganciclovir*, que é administrada aos doentes após terapia com o gene *tk*, num metabolito tóxico e letal. Este metabolito é letal não só para as células cancerosas que passaram a expressar o gene "suicida" mas também, para as outras células cancerosas circundantes (Penque, 2000). Também no cancro, têm-se utilizado genes "marcadores", genes que conferem resistência às drogas e ainda, sequências nucleotídicas *anti-sense*. Estes últimos são moléculas de RNA *anti-sense* que ao serem introduzidos nas células impedem a expressão/tradução das suas correspondentes endógenas - moléculas de RNA *sense* – por emparelhamento de suas bases

nucleotídicas. No entanto, o processo de terapia génica está muito pouco desenvolvido no caso do cancro (Abdelnoor, 2001).

Infelizmente, desordens multigénicas ou multifactoriais, tais como doenças cardiovasculares, pressão alta, doença de *Alzheimer*, artrite e diabetes, seriam especialmente difíceis de serem tratadas usando essa terapia, pois são causadas por efeitos combinados de variações em muitos genes (Zilli, 2000).

Presentemente, a terapia génica contempla somente células somáticas, isto é, exclui a modificação genética das células germinais. Todas as células somáticas possuem, em princípio, a capacidade de receber um gene terapêutico. No entanto, a pré definição de células/tecido alvo, tendo como base a natureza da doença, será sempre desejável.

Existem principalmente dois tipos de estratégias na terapia génica: *ex vivo* - em que as células alvo são geneticamente modificadas fora do organismo e, só depois, transplantadas para o indivíduo, como apresentado na figura 2; e *in vivo* - em que os genes são introduzidos directamente nas células alvo, ou seja no tecido do indivíduo a ser tratado. Uma alternativa muito ambicionada mas que ainda não foi devidamente testada, será a introdução do gene terapêutico na corrente sanguínea e este encontrar o seu caminho em direcção ao tecido alvo (Penque, 2000).

O sucesso da terapia génica depende da eficiência da transferência e dos níveis e regulação no espaço e no tempo da expressão do gene terapêutico, bem como da sobrevivência das células/tecido alvo geneticamente modificados no paciente. Ou seja, a terapia génica resulta na introdução de um gene que permita, ao longo do tempo, a produção de uma dada proteína com fim terapêutico, aliviando ou até mesmo curando a doença.

Como é evidente, os ensaios de terapia génica exigem um protocolo que assegure em primeira análise a segurança e inocuidade do tratamento.

Assim, antes da aplicação em humanos, o gene terapêutico e o sistema de transferência desenvolvido são testados em células em cultura e em animais de experiência. Consoante os resultados destes primeiros ensaios, passa-se então para os ensaios clínicos em pacientes ou em indivíduos saudáveis.

Existem essencialmente três fases de *Ensaio Clínico*:

Fase I – Em que são testadas a toxicidade e a farmacodinâmica;

Fase II – Em que são essencialmente testados os benefícios terapêuticos

Desenvolvimento de processos de recuperação de plasmídeos

CICS - Centro de Investigação em Ciências da Saúde

Fase III – Em que são testadas a eficiência e inocuidade em comparação com outras drogas (Penque, 2000).

O processo global da terapia génica vai desde o simples reconhecimento do motivo da doença ou deficiência, passando por vários passos até atingir o tratamento.

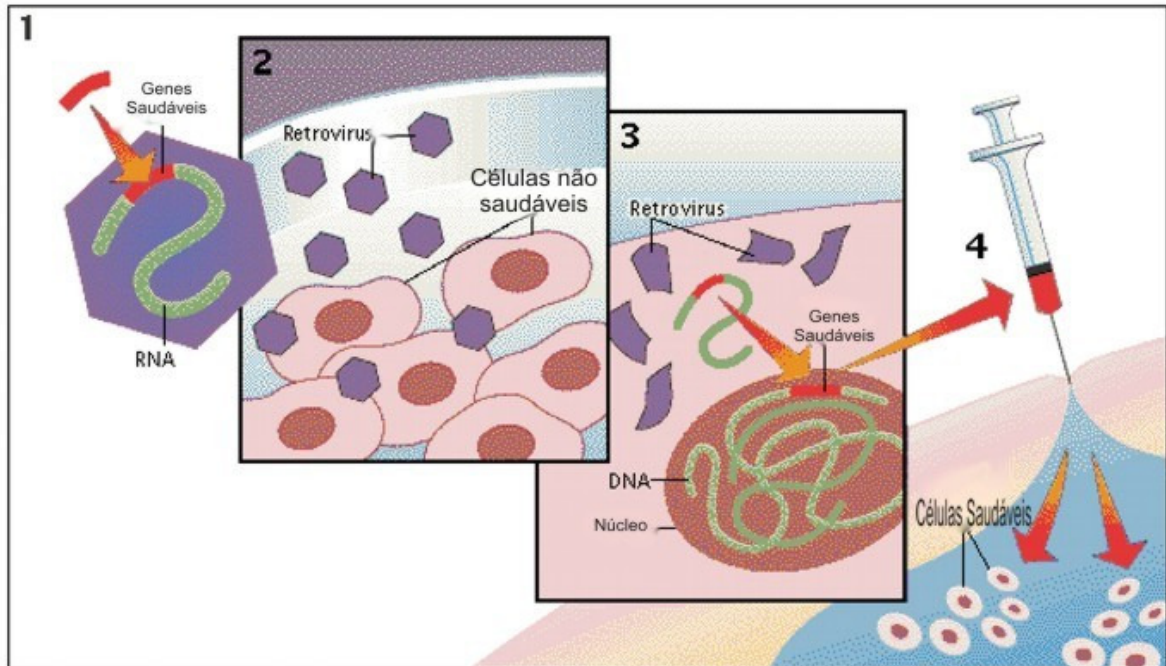


Figura 2: Processo esquemático da terapia génica. Adaptado de Chinese-culture.net

1.1.3 - Vectores

Dos vários problemas a serem vencidos encontra-se o desafio da obtenção de vectores seguros, ou seja, dos veículos de transferência e de transporte do material genético para dentro do corpo humano. Estes vectores, para que a terapia seja efectiva, necessitam de ter várias características favoráveis: actuar directamente no interior da célula a ser modificada; atingir o alvo; ter grande poder de acção com pequenas quantidades de material; industrialização a baixo custo; e principalmente não causar efeitos maléficos.

Os vectores são considerados em duas classes: Virais e Não-virais. Os mais comuns são os Adenovirus, os AAV (*Adeno-associated viruses*), os retrovirus (incluindo os lentivirus), e em menor escala o Herpes simplex virus (HSV) e o vírus *Vaccinia* (MacRae, *et. al*, 2006). Embora possuam uma elevada taxa de transferência genética, eles também podem ser imunogénicos e difíceis de produzir em larga escala (MacRae, *et. al*, 2006).

Os vectores não-virais, por outro lado, geralmente resultam numa transferência genética menos efectiva, mas não têm limitações quanto ao tamanho da banda de genes a inserir, são relativamente não imunogénicos e de fácil fabrico (Breyer, *et. al*, 2002; Foley, *et. al*, 2005).

Existe ainda outra forma de entrega de material genético além destes processos, através de células do próprio organismo, designando-se estes por vectores celulares.

1.1.3.1 - Vectores Virais

Adenovirus

Os adenovirus são um dos vectores mais comuns usados em ensaios de terapia génica. Tratam-se de virus sem envelope com um DNA de cadeia dupla de aproximadamente 36kbp. Como medida de segurança para a sua utilização na terapia génica, os genes E1 e E3 (genes cruciais para a geração de novos vírus) são, normalmente, apagados neste serotipo, tornando a replicação viral restrita (MacRae, *et. al*, 2006).

Embora estes vectores não integrem o genoma das células alvo, apenas infectam as células transitóriamente, os genes são transferidos para ambas as células alvo, divididas e não divididas, promovendo a expressão de um receptor *coxsackie* adenovirus (CAR) à superfície da célula receptora, necessário para a ligação do adenovírus à célula alvo. Curiosamente, foi demonstrado que a expressão da CAR nas células cancerígenas da próstata é mais elevada nas células metastáticas primárias do tumor, o que sugere que tais vectores podem ser particularmente eficazes para a segmentação de genes em metástases (Greco, *et al.*, 2002). Os desenvolvimentos mais recentes demonstram o condicionamento da replicação do adenovírus, promovendo apenas a replicação em células tumorais (Bischoff, *et al.*, 1996). Estes estudos sugerem que os adenovirus mutantes podem ser usados para o tratamento de certos tumores. Contudo, recentemente foi demonstrado que não há correlação entre a replicação viral e a p53 nas células tumorais (McCormick, 2000).

Embora os adenovirus sejam fáceis de manipular, possuam um alto crescimento *in vitro* (Zhang, *et al.*, 1999) e consigam infectar um amplo número de células *in vivo*, existe sempre um grande problema, pois são altamente imunogénicos *in vivo*. As respostas humorais contra as partículas de adenovirus levam à produção de anticorpos de neutralização através da activação de células T e B em resposta às proteínas virais, bloqueando efectivamente a re-administração do vírus (Harvey, *et al.*, 1999). Algumas melhorias no design de PAV (pseudo-adenovirus) têm minimizado a resposta linfocítica para as proteínas de expressão viral, embora as respostas humorais continuem a ser um problema. Esta imunogeneticidade prejudicou severamente a administração de tais vectores virais e levantou sérias preocupações sobre a segurança dos pacientes (Marshall, 1999).

AAV – Adenovirus associado

Os AAV são pequenos, não possuem envelope, DNA linear único parvovirus que não se torna patogénico em primatas (Greco, *et al.*, 2002). Os AAV são vectores promissores de entrega de genes pois eles podem integrar o genoma da célula hospedeira (preferencialmente no cromossoma 19 dos humanos) e persistir durante a vida inteira da célula (Muzyczka, 1992).

No entanto, a natureza imprevisível da integração e as eventuais alterações cromossómicas têm consequências para a terapia génica, influenciando potencialmente tanto a transferência como a sua expressão genética. Por exemplo, se o AAV se integrar no genoma no meio de um sítio de transcrição de uma proteína essencial, promovendo a não transcrição ou a transcrição incorrecta da proteína, leva a inúmeros problemas para a célula hospedeira (Miller, *et al.*, 2002).

O AAV são naturalmente incompetentes na replicação e requerem genes adicionais de outros vírus eficientes semelhantes tal como adenovirus ou HSV (*Herpes-simplex virus*) de modo a produzir partículas virais viáveis na linhagem celular (Kremer, 1997). Isso faz com que a produção de AAV seja problemática, tornando a preparação trabalhosa e que o novo vírus se torne imunogénico devido à contaminação por parte do vírus auxiliar (Kremer, 1997).

Embora o AAV tenha a vantagem de ser pouco imuno ou patogénico (Breymer, *et al.*, 2002; Foley, *et al.*, 2004), uma grande desvantagem é a sua reduzida dimensão (<5 kb) e , portanto, pequena capacidade para aceitar genes terapeuticos (Kremer, 1997).

Retrovírus

Os retrovírus são pequenos vírus de RNA que replicam através de DNA intermediário por uma DNA polimerase. O DNA *reverse* transcrito incorpora o cromossoma da célula hospedeira, e o DNA é posteriormente transcrito pela célula hospedeira através do seu processo comum (Boris-Lawrie, *et al.*, 1994).

Os retrovírus, incluindo os lentivírus, têm sido usados como veículos eficazes para a terapia génica, por serem capazes de integrar o genoma da célula alvo permitindo, a longo prazo, uma expressão genética estável (Boris-Lawrie, *et al.*, 1994). Embora essa integração seja benéfica para a terapia génica, pode levar a sérios efeitos adversos, por exemplo, inserção mutagénica (inserção numa zona não favorável do genoma e, por consequência, perturbação do funcionamento dos genes no seu processo global) activando um proto-oncogene (MacRae, *et. al.*, 2006).

Os retrovírus foram previamente identificados com base na sua habilidade para

causar transformação oncogénica, daí a possibilidade de inserção mutagénica ser preocupante (Hacein-Bey-Abina, *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c). Estudos a nível mundial sobre a integração retroviral estão a revelar novos conhecimentos sobre a preferência dos vectores das diferentes classes na inserção do material genético (Sinn, *et al.*, 2005).

Com a notável excepção dos lentivírus, os retrovírus requerem células em divisão celular para completarem o seu ciclo de vida (Miller, *et al.*, 1990). A patogenicidade de alguns vectores retrovirais, por exemplo o lentivírus, HIV-1, pode também ser um factor limitante.

Embora se provoque a replicação deficiente aos vírus por deleção de alguns genes importantes nessa função, a recombinação com genes, homologos aos previamente apagados, das células hospedeiras pode levar a uma replicação competente do vector, o que promove sérias implicações para um uso seguro como vectores da terapia génica. Em adição a este factor, a pequena zona genómica (<9 kb de DNA) e as dificuldades de obter elevadas cópias para a transferência génica *in vivo* podem constituir um problema, devido à propensão natural para rearranjo dentro do genoma viral que pode causar instabilidade do vírus (Murphy, 1999). O Lentivírus infecta e expressa os genes com eficiência aceitável, tal como no caso das células da prostata, *in vivo* e *in vitro* (Bastide, *et al.*, 2003).

Herper-simplex Vírus (HSV)

O HSV é um vírus que possui um grande DNA de dupla cadeia linear, envolvido por uma cápsula constituída por uma espessa camada de proteína e uma bicamada lipídica. Os vectores de HSV podem ser dependentes ou não de outros vírus, que lhes podem fornecer genes necessários para formar uma partícula viral viável (Greco, *et al.*, 2002). Algumas formas de HSV podem acomodar até 150 kbp de DNA externo, uma vez que o genoma viral não possui muitas sequências virais codificadoras. No entanto, isto significa que os genes e proteínas necessárias para a sua produção e replicação necessitam de ser promovidas por outro vírus, designado por vírus ajudante (Greco, *et al.*, 2002). No entanto o uso destes vírus ajudantes promovem a contaminação (Kwong, *et al.*, 1984). Os HSV que não necessitam vírus ajudantes para a produção de partículas virais viáveis suportam exclusões de genes essenciais, mas isto significa que necessitam de ser propagados em linhas celulares adequados, ou seja, em células que possuam

plasmídeos com os genes que são excluídos do HSV. Desta forma podem ser produzidas elevadas cópias por não haver contaminação por outros vírus, mas leva à sua limitação relativamente à inserção de DNA, pois passa a ter uma capacidade de cerca de 40 kpb (MacRae, *et. al.*, 2006).

Os HSV infectam as células humanas tanto em fase de divisão como as que se encontram estagnadas (Huard, *et al.*, 1997). A principal limitação é a sua citotoxicidade para uma grande série de células alvo (Robbins, *et al.*, 1998). Os seus efeitos citotóxicos podem ser reduzidos pela eliminação de certos genes (Breyer, *et al.*, 2002). Nos ensaios clínicos realizados com este vector, apenas 3 dos 12 pacientes estudados se mantiveram clinicamente estáveis até 22 meses de tratamento, e mostraram também que nenhum dos pacientes sofreu de toxicidade por parte da administração do vírus (MacRae, *et. al.*, 2006).

Vaccinia Vírus

Vaccinia vírus e outros vírus pertencem à família *Poxviridae*, surgem como vectores promissores da terapia génica para a aplicação no tratamento do cancro (MacRae, *et. al.*, 2006). As inserções podem ser superiores a 30 kb, podendo estes vírus ser produzidos em alta escala e fornecer relativamente longa duração da expressão génica na célula alvo (Patel, *et al.*, 2004).

Estes vectores podem infectar as células em divisão ou não, e a recombinação do DNA viral no genoma da célula não é um problema, pois a replicação e a transcrição ocorrem no citosol das células infectadas. A Vaccinia vírus é capaz de infectar a maioria das células alvo com uma eficiência variável (MacRae, *et. al.*, 2006).

Estes vírus têm sido usados para gerar resposta imunitária de protecção a patologias, tal como respostas imuno contra vários tipos de cancro (MacRae, *et. al.*, 2006). Este actua por inserção de um gene para um tecido específico, tal como PSA das células epiteliais da próstata, ou um factor específico de tumor no genoma da vacina, promovendo a produção em largas quantidades da proteína específica pelo vírus, o que por sua vez leva à resposta imunitária contra esta mesma proteína (MacRae., *et. al.*, 2006).

1.1.3.2 - Vectores não virais

Os vectores não virais são normalmente menos imunogénicos que os virais e mais fáceis de produzir em larga escala. No entanto são limitados pela menor capacidade de transfecção e por tempos limitados de expressão na célula hospedeira, o que leva a sua fraca capacidade de utilização para a aplicação como vectores em terapia génica no tratamento do cancro. (MacRae, *et. al*, 2006).

Os vectores não virais podem ser divididos em dois grupos diferentes, químicos e físicos.

Químicos – Os lipossomas são complexos de lípidos catiónicos isolados, ou uma combinação de lípidos neutros com catiónicos e são usados para encapsular plasmídeos com genes para aplicação terapêutica. A estrutura lipídica ultrapassa facilmente a membrana celular e a sua carga positiva promove a formação de ligações com os complexos de DNA. Os lipossomas são fáceis de produzir e não são imunogénicos, podendo transfectar a maioria das células alvo. No entanto, a eficiência da transfecção para as células alvo *in vivo* é baixa, pelo facto do lipossoma possuir muita vulnerabilidade em grande parte dos estágios. Primeiro necessita de estar próximo da célula alvo, ou seja, a injeção terapêutica tem de ser próxima da célula alvo, depois tem de entrar na célula por via endócrina ou por processo fagocítico, e finalmente necessita de escapar às vesículas formadas que promovem a sua degradação enzimaticamente por forma de defesa da célula (MacRae, *et. al*, 2006). A própria administração também pode levar a danos físicos do complexo lipídico (Greco, *et al.*, 2002).

Físicos – Electroporação é um processo no qual as células são expostas a um forte campo electrostático que promove a alteração temporariamente da conformação da membrana celular, facilitando assim a entrada de DNA nú.

Estudos recentes demonstram que este método facilita a entrada de DNA plasmídico nas células nos tecidos *in vivo* (Somari, *et al.*, 2000; Cezamar, *et al.*, 2002), pela aplicação de um campo eléctrico no total da área de interesse. Os parâmetros do pulso eléctrico, tal como a duração e potência, são importantes para a óptima expressão génica, mas estes mesmos parâmetros variam consoante os tipos de tecido (Greco, *et al.*, 2002). As armas de genes podem ser usadas para impulsionar microesferas revestidas de DNA plasmídico às células alvo, onde o DNA é libertado no núcleo (Fígura 3) (Cezamar, *et al.*, 2002). A eficiência de transfecção é geralmente baixa e varia entre 1% e 20%, dependendo da profundidade do tecido (Johnston, *et al.*, 1994). A maior desvantagem deste método é a perda de viabilidade das células alvo por trauma físico, um curto tempo e um baixo nível de expressão génica (visto o DNA não ser incorporado no genoma da célula) e a penetração ser muito superficial quando o pulso eléctrico é aplicado externamente (Greco, *et al.*, 2002).

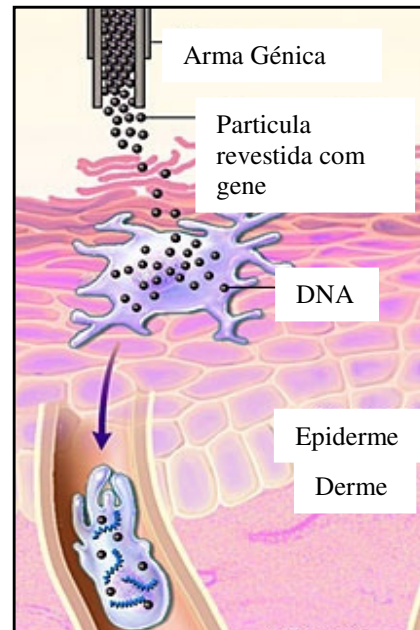


Figura 3 – Utilização de “arma génica” para incorporação de DNA em células de Langerhan’s da pele. Adaptado de www.ifpma.org/Influenza

Recentemente, uma nova técnica, *Nucleofection*, foi desenvolvida baseada numa combinação única de parâmetros eléctricos e soluções específicas consoante o tipo de células. Com esta técnica o DNA é transportado directamente ao núcleo. A vantagem desta tecnologia é a capacidade de transfecção de células não proliferadas e células primárias, que são difíceis de transfectar com as técnicas padrão, tal como células dendríticas e monócitos primários, onde a expressão génica é independente do estado de divisão celular (Martinet, *et al.*, 2003). A maior limitação desta técnica é a perda de viabilidade de alguns tipos de células após a transfecção, que pode ser devido ao stress eléctrico a que é exposta a célula (MacRae, *et al.*, 2006).

1.1.3.3 - Vectores Celulares

Idealmente, os vectores de terapia génica devem possuir a capacidade de entregar o transgene especificamente às células alvo ou tecidos, serem não imunogénicos, patogénicos ou mutagénicos, e devem ser relativamente baratos e de fácil reprodução. Tais vectores não existem, e isto levou ao desenvolvimento de vectores baseados em células para a entrega do material génico. Estes envolvem o uso de células periféricas do sangue que é sabido migrarem naturalmente para os tumores, tais como as células T, macrófagos ou células dendríticas. As células são isoladas a partir do paciente, transfectadas/infectadas *ex vivo* e, em seguida, voltam a ser injectadas no mesmo doente. Como tal, as células são não imunogénicas e são reconhecidas pelo próprio paciente. Algumas formas de bactérias não patogénicas foram também usadas para infiltrar e crescer preferencialmente em tumores (MacRae, *et. al*, 2006).

1.1.4 - DNA plasmídico (pDNA)

As vacinas de DNA baseiam-se na inserção de plasmídeos bacterianos que são desenhados para expressar um gene numa célula hospedeira. O gene inserido codifica uma proteína, que pode ser entre muitas coisas, um antigénio de uma doença, de um tumor, etc. (Abdelnoor, 2001).

Os plasmídeos são moléculas circulares fechados de cadeia dupla de DNA que estão separadas do DNA cromossómico, não essenciais à célula (Figura 4) (Debyser, 2003). Geralmente ocorrem em bactérias e por vezes também em organismos eucarióticos. O seu tamanho varia entre 1 e 250 kbp (milhares de pares de bases). Estes não representam mais do que 1% do conteúdo celular bacteriano (Sandberg *et al.*, 2004).

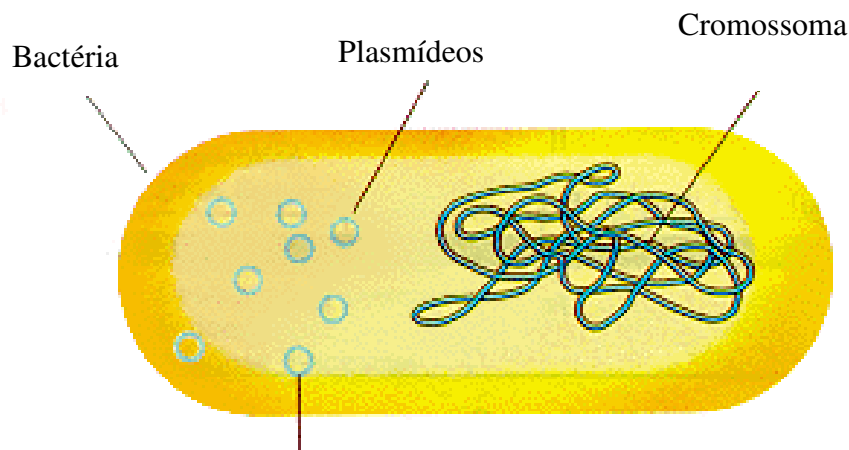


Figura 4 – Esquema de uma bactéria com plasmídeos no seu interior. Fonte: <http://dragon.seowon.ac.kr/~bioedu/appbio/gen02.htm>

Existem entre uma, para grandes plasmídeos, até cinquenta cópias de um mesmo plasmídeo numa única célula. Eles replicam-se autonomamente e são herdados com diferentes graus de fidelidade, mas não são essenciais para a viabilidade celular. Embora seja conhecida uma vasta variedade de plasmídeos e estejam classificados em diferentes grupos, nem todos se destinam ao uso em bioprocessos. Numa única célula podem coexistir vários tipos diferentes de plasmídeos. A *E. coli*, por exemplo, tem até sete. Dois plasmídeos podem ser incompatíveis, e a sua interação resulta na destruição de

um deles. Os plasmídeos podem, portanto, ser colocados em *grupos de incompatibilidade*, que dependem da sua capacidade de coexistir numa única célula.

Uma forma óbvia de classificar os plasmídeos é pela função que desempenham. Existem cinco classes principais:

- *Plasmídeos de Fertilidade (F)*, que contém apenas *tran-genes*. A sua única função é a iniciação da conjugação bacteriana.
- *Plasmídeos de Resistência (R)*, que contém genes que os tornam resistentes a antibióticos ou venenos.
- *Col-plasmídeos*, que contém genes que *codificam* colicinas, proteínas que podem matar outras bactérias.
- *Plasmídeos degradativos*, que permitem a digestão de substâncias pouco habituais, como o toluole ou o ácido salicílico.
- *Plasmídeos de virulência*, que transformam a bactéria num agente patogénico.

As moléculas de pDNA estão enroladas no espaço, formando uma estrutura altamente ordenada que se denomina por plasmídeo superenrolado.

Quanto maior a dimensão da molécula de pDNA, maior a flexibilidade e capacidade de formar estruturas ordenadas em solução (Huber *et al.*, 1998). Por sua vez, quanto maior o enrolamento da molécula, maior a capacidade de criar pontes de hidrogénio aumentando assim a sua estabilidade na estrutura enrolada. A estabilidade do enrolamento da molécula deve-se principalmente às bases de GC posicionadas em pontos de *loop*, promovendo ligações entre si, o que leva à estabilidade da estrutura terciária da molécula (Moody e Belilacqua, 2003).

O tamanho elevado dos plasmídeos também influencia outras propriedades como a viscosidade, o coeficiente de difusão, entre outros (Urthaler *et al.*, 2005; XU Zhi-nan *et al.*, 2004). As moléculas de pDNA estão também presentes noutras formas além da superenrolada, como a forma circular aberta (oc), a forma linear (l) ou ainda na forma desnaturada ou oligomérica. Estas isoformas derivam da isoforma superenrolada (Urthaler *et al.*, 2005).

A isoforma superenrolada, representada na figura 5, é considerada a mais apropriada para aplicações terapêuticas (Urthaler *et al.*, 2005). Não é realmente entendido, mas tornou-se aceite que a isoforma superenrolada é mais efectiva a transferir os genes que as outras isoformas (Prazeres *et al.*, 1999).

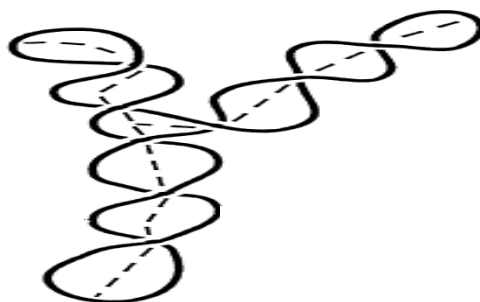


Figura 5 – Modelo esquemático da isoforma superenrolada (sc). Adaptado de Prazeres *et al.*, 1998

O plasmídeo pode ser classificado em duas categorias de acordo com a sua instabilidade: a instabilidade segregacional e a instabilidade estrutural.

A instabilidade segregacional é definida como a perda de todo o plasmídeo devido a uma partição deficiente durante a divisão celular. A instabilidade estrutural é definida como a mudança na estrutura do plasmídeo devido a inserção, deleção ou rearranjo do DNA, o que pode resultar na perda de uma função genética desejada (Zabriskie *et al.*, 1986).

A estabilidade plasmídica deve-se à genética do plasmídeo e é fortemente influenciada pela genética e fisiologia do hospedeiro, normalmente bactérias, uma vez que diferentes plasmídeos podem exibir diferentes graus de estabilidade no mesmo hospedeiro (Zabriskie *et al.*, 1986).

O uso de pressão selectiva durante o crescimento pode, por vezes, eliminar os efeitos da instabilidade segregacional nos processos fermentativos. Contudo, o uso de pressão selectiva pode não ser viável em larga escala e não controlar os problemas de instabilidade segregacional (Zabriskie *et al.*, 1986).

Os plasmídeos de elevado número de cópias (superiores a 25) podem impor um elevado peso metabólico nos seus hospedeiros, proporcionando uma vantagem para as células sem plasmídeo presentes na cultura. Consequentemente, mesmo um pequeno número de células sem plasmídeo pode rapidamente dominar numa fermentação (Carnes *et al.*, 2005).

O DNA plasmídico é modificado, por engenharia genética, sendo posteriormente produzido em bactérias, mais habitualmente em *E. coli* (Abdelnoor, 2001).

Os processos de design desenvolvidos nos plasmídeos conferem-lhes determinadas características de selectividade (Figura 6). Primeiro, estes são desenhados

para serem fortes promotores em células eucarióticas na transcrição dos genes pretendidos; segundo, estão presentes os genes de LacZ, que codifica os primeiros 146 aminoácidos da enzima β -Galactosidase; possui ainda um sítio clone do LacZ onde são inseridos os genes pretendidos; é colocado uma sequência terminal de 3' de poliadenilação, derivada de hormona de crescimento bovina (BGH) (que promove estabilidade ao RNAm na transcrição); uma origem de replicação procariótica para a amplificação em bactéria; e por fim uma zona de genes de selectividade, que promove resistência a antibióticos, como a *kanamicina* ou *ampicilina* (Adbelnoor, 2001).

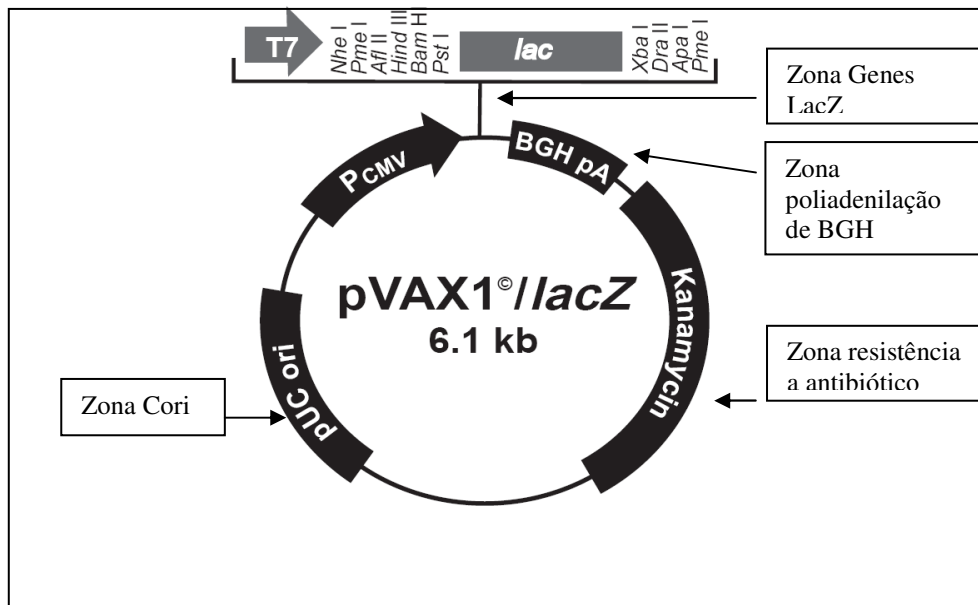


Figura 6 – Modelo esquemático de um plasmídeo geneticamente modificado. Adaptado de *Invitrogen*

Os plasmídeos são ferramentas importantes nos laboratórios de genética e bioquímica, onde são usados rotineiramente para multiplicar ou *expressar* genes específicos. Há muitos plasmídeos com esse fim disponíveis no mercado. Inicialmente, o gene a ser replicado é inserido num plasmídeo. Este plasmídeo deverá conter, além do gene inserido, um ou mais genes capazes de conferir resistência antibiótica à bactéria que servir de hospedeiro.

Os plasmídeos são então inseridos em bactérias por um processo chamado *transformação* (Debyser, 2003), e estas são depois incubadas em meio rico em antibiótico(s) específico(s). Então, as bactérias que contiverem uma ou mais cópias do plasmídeo expressam (fazem proteínas a partir de) o gene que confere resistência aos antibióticos. As bactérias crescem em meio selectivo, contendo isopropiltiogalactosido

(IPTG – inductor do operão lactose), X-gal e um antibiótico (kanamicina ou ampicilina) (Abdelnoor, 2001).

Tipicamente, a célula produz uma proteína que irá ser destruída pelos antibióticos que, de outra forma, matariam a célula. Os antibióticos matam as células que não receberam plasmídeo, porque não possuem os genes de resistência aos antibióticos (Abdelnoor, 2001). O resultado é que só as bactérias com a resistência aos antibióticos sobrevivem, e estas são as mesmas que contém o gene a ser replicado. Desta forma, os antibióticos actuam como filtros que seleccionam apenas as bactérias modificadas. E agora estas bactérias podem ser cultivadas em grandes quantidades, recolhidas e destruídas para isolar o plasmídeo de interesse.

Relativamente à purificação, a molécula de DNA dupla hélice é polianiónica, devido à presença de grupos fosfatos do ácido nucleico o que permite ser capturada em resinas derivatisadas com grupos funcionais carregados positivamente. Este representa o mecanismo mais usual da purificação de plasmídeos por cromatografia, designada por cromatografia de troca-iónica (Eon-Duval *et al.*, 2004).

Um uso importante dos plasmídeos é a produção de grandes quantidades de proteínas. Neste caso, cultivam-se as bactérias que contém um plasmídeo que inclui o gene que codifica a proteína que se pretende produzir. Da mesma forma que uma bactéria produz proteínas que lhe conferem resistência aos antibióticos, também pode ser induzida a produzir grandes quantidades de proteínas a partir do gene que nelas foi introduzido. Esta é uma maneira barata e simples de produzir a proteína que ele codifica - por exemplo, a insulina - ou até mesmo antibióticos (Abdelnoor, 2001).

O que se pretende, mas ainda não é possível, são antigénios fáceis de usar e seguros que possam ser processados endogenamente e eventualmente activar Linfócitos T citotóxicos. A activação destes promove a destruição da célula parasita infectada (Abdelnoor, 2001).

Alguns benefícios das vacinas de pDNA em relação às vacinas convencionais incluem a estabilidade e potencial memória imunitária contra múltiplas doenças com uma única simples inoculação (Penque, 2000).

No entanto, a maior e derradeira desvantagem deste método consiste na morosidade da micro-injecção que só pode atingir uma célula de cada vez, o que implica um trabalho laborioso que não se torna praticável para a entrega de DNA *in vivo* (Prazeres *et al.*, 1999).

Dos métodos físicos, aquele que se afigura com uma concepção mais simples e mais apelativa é a injecção de DNA livre directamente no núcleo celular através de micro-injecção.

Existem várias formas de injectar o pDNA e já foram realizados bastantes ensaios em modelos animais. Estes incluem, intra-muscular, subcutâneo, intra-peritoneal, intra-dermal, intravenoso, oral, rectal, intra-bursal, intra-orbital, intra-nasal, etc. (Abdelnoor, 2001; Simmonds, *et al.*, 1997; Spier, 1996; Fynan, *et al.*, 1993; Tigh, 1998).

1.1.5 - Controlo de Qualidade

O “*Food and Drug Administration*” (FDA), órgão regulador norte-americano, ainda não aprovou nenhum produto de terapia génica para a venda. Entretanto, as pesquisas relacionadas com a TG continuam a crescer e o FDA está muito empenhado na supervisão dessa actividade. Desde 1989, este órgão recebeu cerca de 300 requisições de investigadores clínicos e de fabricantes para o estudo e o desenvolvimento de produtos de terapia génica. Com o objectivo de garantir a segurança das pessoas envolvidas em estudos e daquelas que eventualmente recebam produtos de terapia génica, o FDA está a supervisionar actualmente cerca de 210 protocolos activos de estudos (Xu Zhi-nan, 2005, Urthaler *et al.*, 2005). A própria EU contém um órgão regulador neste âmbito, o EMEA (*European Medicines Agency*), controlando também, da mesma forma, a qualidade dos produtos ligados à saúde (Tabela 1).

As agências de controlo fornecem guias e protocolos de qualidade que auxiliam a produção e desenvolvimento destes processos. Relativamente aos plasmídeos, as especificações e métodos recomendados servem para determinar o grau de pureza, segurança e potência da amostra.

Desenvolvimento de processos de recuperação de plasmídeos

CICS - Centro de Investigação em Ciências da Saúde

Tabela 1 – Critério e métodos analíticos para plasmídeos pelas normas da EMEA.

Adaptado de Prazeres e Ferreira, 2004.

<i>Especificações</i>	<i>Crítérios Aceitáveis</i>	<i>Métodos Analíticos</i>
Plasmídeo		
<i>Aparência</i>	Solução límpida e clara	Inspecção visual
<i>Identidade do plasmídeo</i>	Mapa de restrição	Análise completa da sequência, PCR
<i>Homogeneização do plasmídeo</i>	>90% da isoforma superenrolada	Gel de agarose e densimetria
<i>Concentração do plasmídeo</i>	De acordo com as aplicações	A ₂₆₀ , HPLC, fluorescência
<i>Potência</i>	De acordo com as aplicações	Transfecção celular
Impurezas		
<i>Proteínas</i>	Não detectável, <0,01 µg/dose	Ensaio de BCA, SDS-Page
<i>RNA</i>	Não detectável	Gel agarose 0,8%
<i>gDNA</i>	<0,05 µg/µg plasmídeo, <0,01µg/dose	Hibridização (blots), PCR, fluorescência
<i>Endotoxinas</i>	<0,1EU/µg plasmídeos	Ensaio LAL

1.1.6 - O futuro da terapia génica

Na terapia génica, permanece ainda por desenvolver um sistema eficaz de transferência génica que possibilite a expressão da proteína terapêutica, no tempo/espço e nas quantidades necessárias, que seja capaz de transformar um indivíduo doente num indivíduo saudável. O aprofundar dos conhecimentos básicos da biologia da célula/tecido e da sua complexa relação com o organismo como um todo é sem dúvida um factor essencial para o sucesso da terapia génica. O esclarecimento dos efeitos funcionais da proteína anómala que se pretende substituir e/ou silenciar através da terapia génica, parece também um factor fundamental. Na fibrose quística, por exemplo, muito se tem avançado neste sentido, o que tem possibilitado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em alternativa à terapia génica. Denominadas, recentemente, por terapia de reparação proteica, estas terapias têm por finalidade utilizar drogas específicas para repor a funcionalidade normal da proteína mutada (Penque, 2000). Estas drogas variam consoante o defeito a ser reparado que, por sua vez, depende do tipo de mutação encontrada. Algumas destas drogas já se encontram em fase I de ensaios clínicos.

No futuro, um ou outro método quer de transferência génica quer de terapia de reparação proteica, poderá ser aplicado clinicamente com objectivo terapêutico. E, uma vez que dificilmente se reunirão numa única metodologia, a perfeição e a eficácia desejada, parece também plausível a combinação de diferentes estratégias terapêuticas na resolução de um único problema clínico (Penque, 2000).

1.2 – Recuperação de Plasmídeos

Os sistemas biológicos têm uma composição extremamente complexa e o interesse comercial nos bioprodutos produzidos depende do processo utilizado e do grau de pureza, tornando-os respeitantes de certos requerimentos para o seu uso final.

As indústrias farmacêuticas e biotecnológicas necessitam de produtos altamente puros, particularmente se forem injectáveis e produtos de organismos geneticamente modificados, para assegurar um futuro tratamento saudável.

Regulações estritas e códigos de prática estão estipulados por entidades reguladoras, tal como FDA ou EMEA.

Os processos desenvolvidos têm de ser totalmente controlados para que no final o produto pretendido possua altos níveis de pureza.

O processo de lise celular é o primeiro passo do processo de extracção de plasmídeos das células após a fermentação, sendo este um processo global complexo, tal como demonstra a figura 7 seguinte, onde está representado um processo global desenvolvido para a produção e purificação de pDNA para aplicação em terapia génica.

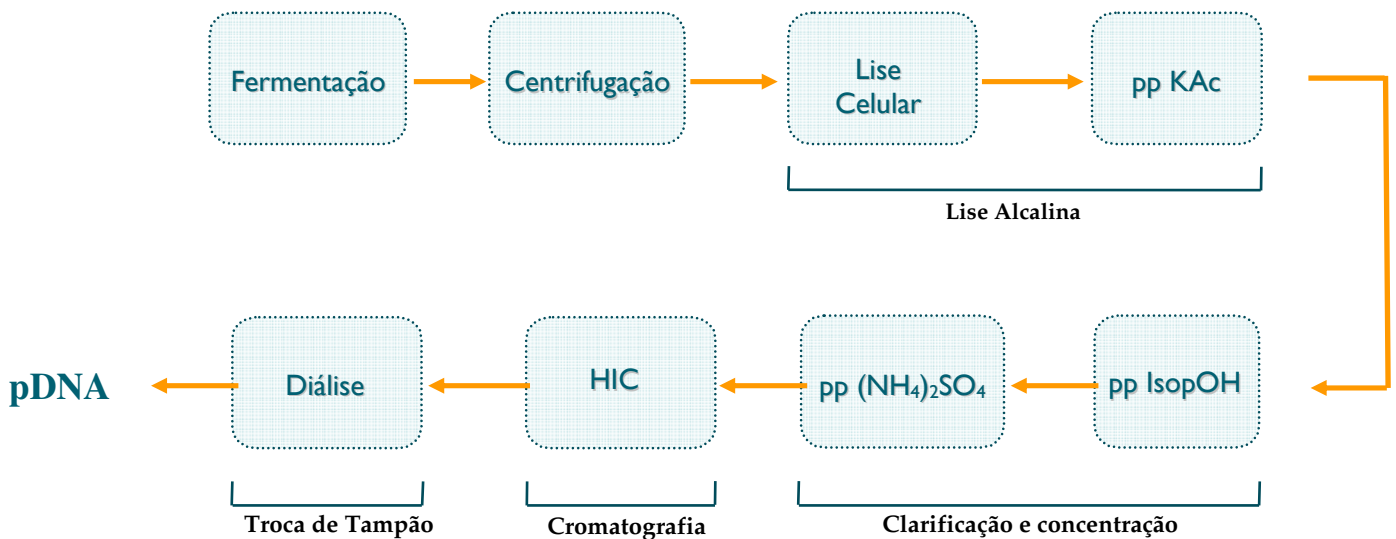


Figura 7 – Esquema global do processo de produção e purificação de pDNA. Adaptado de: Prazeres *et al.*, 2007.

Nos últimos anos tem aumentado o número de estudos para o desenvolvimento de processos viáveis para produção em larga escala de produtos complexos e de alto valor de agentes microbianos. A produção de plasmídeo por *Escherichia coli* é um desses casos muito estudados e com evoluções notáveis nos últimos anos.

Todos os produtos têm obrigatoriamente de passar por processos pós produção para serem obtidos em altos valores de purificação, e estes têm sido a grande barreira desta área.

Sendo o processo de lise celular o primeiro passo pós-produção, este vai ter um grande grau de influência sobre todos os processos posteriores que irão ser aplicados até à purificação da biomolécula desejada.

A escolha da estirpe hospedeira também afecta o processo de purificação, uma vez que existem estirpes que produzem elevadas quantidades de material para formação de cápsula, o que pode afectar a colheita das células e o processo de lise.

Como hospedeiro, a *Escherichia coli* é o microrganismo mais utilizado em biotecnologia para a produção de DNA plasmídico e proteínas, sendo o principal objectivo o crescimento deste microrganismo até obtenção de elevadas densidades celulares.

A *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é uma bactéria *Gram-negativa*, aeróbia ou anaeróbia facultativa (Vollmer, *et al.*, 2007).

Os hospedeiros mais usados para produção de plasmídeos são os derivados DH5- α e XL1 Blue da *Escherichia coli*.

A parede celular é uma estrutura rígida, muito complexa e robusta, que promove a protecção da célula de condições adversas da ambiente. Bioquimicamente, a parede celular actua como um agente regulador e controlador quando a célula troca nutrientes e produtos metabólicos com o meio exterior. Funciona também como protector da célula contra agressões físicas variadas (Vollmer, *et al.*, 2007).

A constituição física da parede celular é extremamente complexa e depende do tipo de organismo que está a ser considerado, da idade da célula e da sua fisiologia de crescimento. No entanto todas as células contêm invariavelmente polissacáridos, lípidos e proteínas rearranjadas em estruturas tridimensionais.

Diferenças em detalhes na sua constituição química qualitativa e o rearranjo dos seus blocos construtivos na sua estrutura supramolecular são espelhados por diferenças na sensibilidade das células para a desintegração (Vollmer, *et al.*, 2007).

Alguns produtos da constituição da parede celular são importantes armas na hidrólise ácida, como:

- Aldosaminas, os constituintes principais da parede celular, onde estão incluídos a N-acetilglucosamina, o ácido N-acetilmurâmico e a galactosamina (em pequenas quantidades).
- Aminoácidos; embora se encontre uma grande variedade de aminoácidos nas paredes celulares, geralmente na construção de proteínas, existem pelo menos três aminoácidos identificados na composição da parede celular, que são a D-alanina, L-alanina, D-ácido glutâmico e L-lisina.
- Ácidos teicóicos; Apenas encontrados em *Gram-positivas*, e as duas formas mais comuns estão localizados na parte exterior da parede celular, que são o fosfato de poliribitol e fosfato de poliglicerol.
- Açúcares como a glucose, galactose, manose, entre outros.
- Lípidos, em menor quantidade que nos outros organismo, e encontram-se principalmente em *Gram-negativas*.

A estrutura básica elementar é composta por N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), ligados por ligações glicosídicas β -(1-4), pelo qual o lado tetrapeptídico da cadeia é atacado (Vollmer, *et al.*, 2007).

A D-alanina terminal do péptido de uma cadeia polissacárida promove a união ao polissacárido adjacente directamente como na *E. Coli*.

A mureína, ou ácido N-acetilmurâmico, é o maior componente da parede celular nas bactérias *Gram-positivas*, sendo a sua espessura de 200-800Å. Nas *Gram-negativas* a espessura da parede é muito mais fina, atingindo no máximo 100-150Å, mas é mais complexa e estratificada sobre o ponto de vista da microscopia electrónica, com três camadas envolvendo a membrana citoplasmática (uma interna e rígida camada de peptidoglicano) e uma dupla camada (constituída internamente por lipopolissacáridos e externamente por lipoproteínas) (Figura 8). Esta dupla cadeia é importante fisiologicamente e possui propriedades imunológicas. Os lípidos e proteínas

constituintes são importantes na estabilização da estrutura da parede celular, que ao serem retiradas promove uma parede celular mais fraca (Vollmer, *et al.*, 2007).

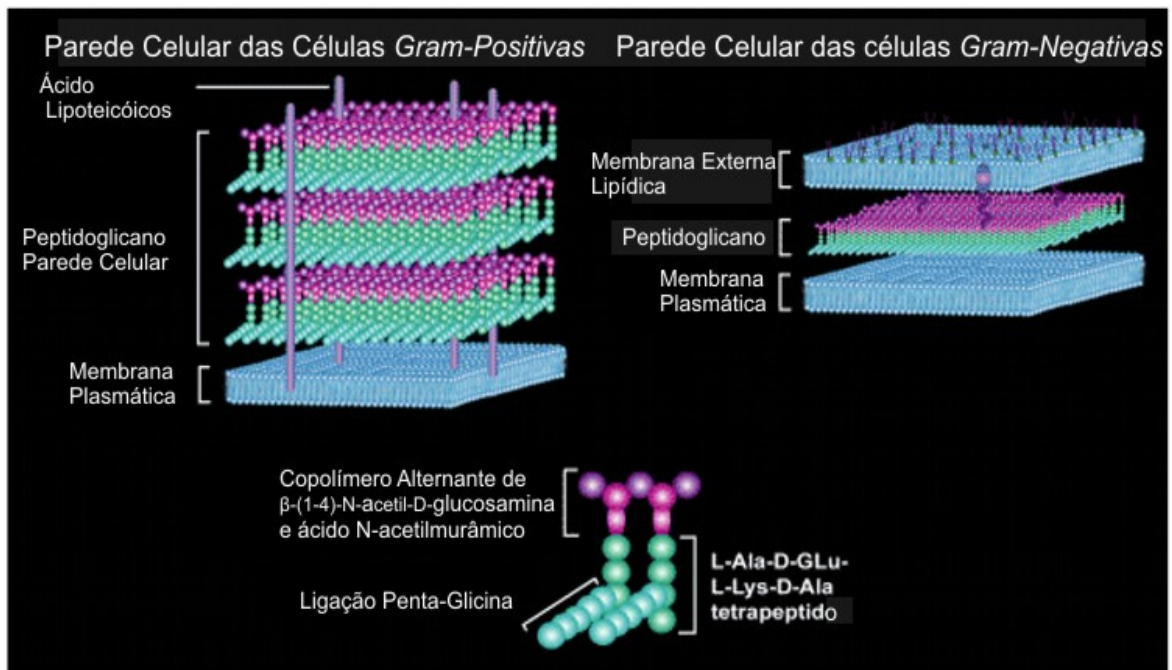


Figura 8: Composição das paredes celulares das *Gram-positivas* e *Gram-negativas*. Fonte: www.sigmaaldrich.com

Como um passo essencial para a realização de análises químicas celulares dos sistemas microfluídicos, a lise celular tem sido demonstrada em inúmeros casos nos últimos anos (Wang, *et al.*, 2006).

A selecção da grande parte dos diferentes processos de lise celular existentes depende do objectivo e do tipo de organismo ao qual se pretende impor esse mesmo processo. Se o objectivo é o isolamento de organelos ou produtos internos sem danificar os estudos posteriores dos mesmos, então é escolhido um processo suave.

Por outro lado, organismos diferentes possuem diferentes susceptibilidades de desintegração, dependendo do tamanho, forma, idade, camadas e condições de crescimento e estruturas das paredes celulares dos mesmos. O pH da suspensão e temperatura afectam a susceptibilidade do rompimento celular.

Existe uma grande variedade de processos já descritos para o rompimento celular, que se diferenciam em vários pormenores, como demonstra o esquema seguinte, figura 9:

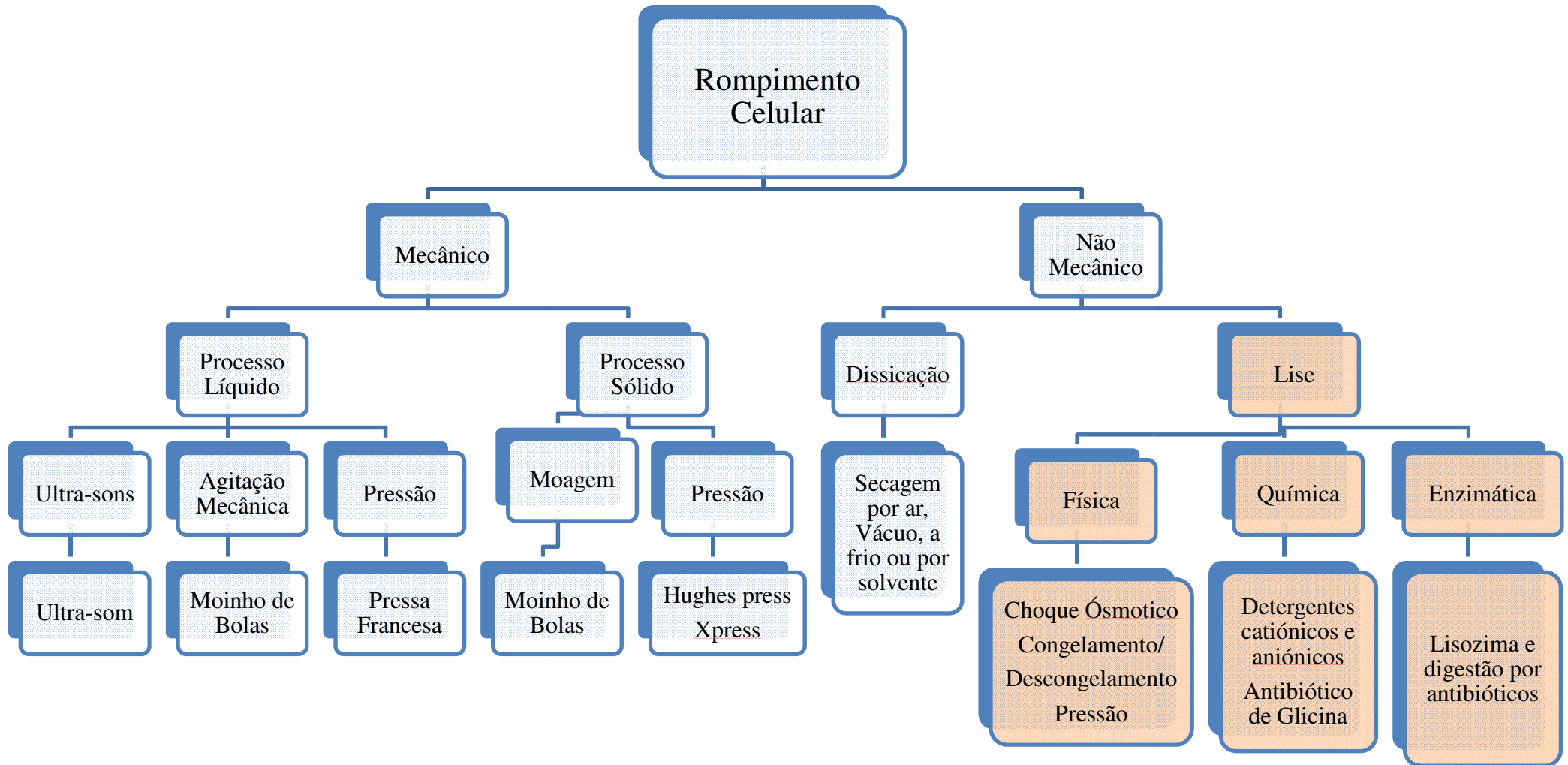


Figura 9: Modelo esquemático dos tipos de rompimento celular. Adaptado de *Recovery Processes for Biological Materials*, 1993

Os processos mecânicos, como sonificação, e processos de lise física para o rompimento celular apresentam algumas desvantagens, pois impõem o uso de técnicas de altas energias e geram altas temperaturas que podem promover a desnaturação das biomoléculas pretendidas. Por outro lado não são específicas para os diferentes organismos, que por sua vez leva a altos valores de perdas dos produtos pretendidos e a altos valores de contaminação finais (Jaroszeski, *et al.*, 2000).

Os processos de lise foram desenvolvidos para minimizar esses efeitos, em particular os processos químicos e enzimáticos, tornando-se estes mais atractivos no ponto de vista biotecnológico.

Os processos químicos promovem a modificação de quebras na parede celular induzidas por soluções ácidas, alcalinas, surfactantes (por exemplo sais biliares) e solventes orgânicos (por exemplo isobutanol) que podem ser adicionadas à suspensão celular. Tais compostos reagem com a membrana dissolvendo-a ou reagindo com os lípidos constituintes da mesma (Wang, *et al.*, 2006). Os agentes surfactantes dissolvem os lípidos presentes na constituição da parede celular, ao passo que os solventes orgânicos actuam da mesma forma mas, por difusão intracelular, eles também destroem membranas dos organelos intracelulares, o que leva a que algumas enzimas, tal como proteases, sejam libertadas. Neste tipo de processos é necessário ter atenção à degradação que pode ser causada por estes reagentes às biomoléculas pretendidas, particularmente com soluções ácidas ou alcalinas. Apesar da sua vasta utilização, a utilização dos agentes líticos na lise química podem desnaturar as biomoléculas e interferir com ensaios biológicos posteriores (Wang, *et al.*, 2006).

Como um caso especial, a água tem sido usada para promover lise osmótica celular (Li e Harrison, 1997).

A lise térmica tem sido utilizada para lise celular a alta temperatura (~94°C). Por sua vez não um processo muito prático pois a maioria das biomoléculas desnaturam (Wang, *et al.*, 2006).

A lise eléctrica tem ganho alguma popularidade nos últimos anos. Baseia-se em processos de electroporação, aplicando campos eléctricos com voltagens definidas que promovem uma reorientação da membrana a nível lipídico (Wang, *et al.*, 2006).

A nível enzimático, os processos são realmente mais atractivos, pois aumentam a selectividade da lise, sendo específico para o produto que se pretende isolar; promovem um aumento de rendimento da extracção; minimizam os danos na biomolécula

pretendida; requerem uma ligeira condição de pH e temperatura, o que é mais simples que em processos químicos; e principalmente não promovem o aparecimento de detritos no final do processo. As enzimas não actuam individualmente na degradação da parede celular, sendo necessária uma mistura de várias enzimas que actuam de forma sinérgica. Na bactéria, a mistura de glucosidases, N-acetilmuramil-L-amidase e peptidases podem promover a degradação do peptidoglicano, mas no caso das espécies *Gram-negativas*, é necessário um tratamento prévio com um agente surfactante activo para remover os lípidos externos da dupla camada. A grande desvantagem do uso de mistura complexas de enzimas é o seu elevado custo, o que torna a recuperação das mesmas após o ensaio algo a ter em conta, sendo este mesmo processo, normalmente, dispendioso (Jaroszeski, *et al.*, 2000).

1.2.1 - Lise Alcalina

Nos finais dos anos 70, Birnboim e Doly (1979) desenvolveram um processo ao qual deram o nome de lise alcalina, que é hoje em dia um dos processos mais usados para a purificação de DNA plasmídico recombinante.

Este processo é simples e baseia-se numa desnaturação alcalina selectiva de DNA cromossomal de elevado peso molecular enquanto que o DNA circular continua em cadeia dupla (Birnboim e Doly, 1979).

O processo desenvolvido por esta dupla de cientistas pretendia obter um pDNA altamente puro para sofrer digestão por enzimas de restrição e assim serem usados para a transformação de outras células. Criaram assim um processo mais versátil que os processos conhecidos anteriormente. Os trabalhos descritos anteriormente mostravam que um ajuste do pH, por volta de 12,0-12,5, promoviam a desnaturação do DNA linear mas não das formas circulares, e esta propriedade permitia a purificação de DNA circular, tornando-se este o ponto de partida de Birnboim e Doly.

As células contendo plasmídeo eram tratadas com lisozima para quebra da parede celular e posteriormente após lise completa eram tratadas com SDS e NaOH.

Pela escolha cuidadosamente do rácio apropriado para a suspensão das células em solução de NaOH, reproduz-se um valor de pH alcalino obtido sem a necessidade da utilização de medidores de pH, que é controlado com a adição de glucose promovendo assim a um tampão de pH (Birnboim e Doly, 1979).

O DNA cromossomal, que continua na forma de elevado peso molecular, é selectivamente desnaturado e quando a lise é neutralizada pelo acetato de sódio ácido, a maioria do DNA cromossomal volta a agregar-se mas numa forma insolúvel. Simultaneamente a alta concentração de acetato de sódio causa precipitação de complexos de SDS-proteínas e RNA com altos pesos moleculares (Birnboim e Doly, 1979).

Desta forma, a maioria dos três maiores contaminantes macromoleculares no processo são co-precipitados e podem ser removidos por simples centrifugação. O DNA plasmídico e restos de RNA de baixo peso molecular são recuperados no sobrenadante por precipitação com etanol (Birnboim e Doly, 1979).

Desenvolvimento de processos de recuperação de plasmídeos

CICS - Centro de Investigação em Ciências da Saúde

Esta extracção envolve a exposição a um pH alcalino para desnaturação de DNA cromossomal. No entanto, o DNA circular ligado de forma covalente quando exposto a um pH superior a 13, passa a estar desnaturado irreversivelmente (Birnboim e Doly, 1979).

Trata-se de um método simples e de fácil utilização. Este mesmo processo foi sofrendo algumas alterações, tendo sido adaptado para maior rentabilidade e menor custo e ao mesmo tempo maior versatilidade para os diferentes tipos de células.

1.2.2 - Choque Osmótico

Neu e Heppel, baseados em estudos anteriores relativos à libertação de enzimas pela *E. coli*, desenvolveram um novo processo de lise celular. Os estudos anteriores demonstravam que determinadas enzimas se localizavam perto da superfície celular facilitando a sua saída da célula (Neu e Heppel, 1965).

Baseados nesta mesma ideia, desenvolveram um novo processo de lise celular para a libertação de enzimas com alto rendimento sem danificar muito a viabilidade das células. Este procedimento envolvia choque osmótico. A *E. coli* era primeiro suspensa numa solução concentrada de sucrose, que não penetrava as células, e tetra-acetato de etilenodiamina. Posteriormente estudaram a média/baixa pressão osmótica criada. Este fenómeno promovia a libertação das fosfatases e fofodiesterases cíclicas em cerca de 70% da sua totalidade da zona periplasmática celular (Neu e Heppel, 1965).

As células são sujeitas a choque osmótico por um processo padrão: as células são suspensas em 80 ml de solução contendo 20% de sucrose 0,03M em Tris-HCl, com uma temperatura de 24°C. A suspensão é tratada posteriormente com EDTA dissódio para promover uma concentração de 1×10^{-3} M e misturada num frasco em agitação (180 rpm) durante de 10 minutos. Seguidamente são centrifugadas a 13000 g em ambiente frio. O sobrenadante é removido e o *pellet* é rapidamente misturado com um volume de água fria igual ao volume de células original. A suspensão é misturada em banho de gelo durante 10 minutos e centrifugada novamente, e o sobrenadante, denominado água de lavagem, é desprezado (Neu e Heppel, 1965).

Obtém-se assim as biomoléculas presentes no espaço periplasmático sem contaminação do material intracelular (Neu e Heppel, 1965).

1.2.3 - Lise Eléctrica

O uso de pulsos eléctricos tem sido aplicado nos sistemas vivos *in vitro* desde o início dos anos 80.

Ficou estabelecido desde então, que o efeito primário do tratamento eléctrico nas células é a indução do aumento de permeabilidade das membranas para moléculas exógenas. O estado de aumento de permeabilidade foi notado temporariamente e poderia ser induzido com um pequeno ou mesmo inexistente efeito na viabilidade celular (Wang, *et al.*, 2006).

Este fenómeno físico foi designado por electroporação. O fenómeno de electroporação membranar metodologicamente compete numa técnica eléctrica para lípidos e proteínas lipídicas membranares, poros permeáveis transitórios e reversíveis, por pulsos de voltagem eléctrica (Eberhard, *et al.*, 2000).

Vários estudos publicados demonstram que a electroporação pode ser aplicada a qualquer tipo de célula. Alguns destes estudos demonstram também a entrega de drogas, DNA, anticorpos, proteínas e moléculas fluorescentes. O uso de electricidade para mediar a entrega desse tipo de moléculas *in vitro*, provaram ser uma ferramenta de investigação incalculável para os cientistas (Eberhard, *et al.*, 2000).

A lise eléctrica baseia-se em processos de electroporação. Num processo típico de electroporação, aplicando pulsos eléctricos com voltagens definidas provoca a formação de pequenos poros na membrana celular por reorientação das moléculas lipídicas, como demonstrado na figura 10.

O aquecimento localizado também contribui para a ruptura da membrana celular (Wang, *et al.*, 2006).

Alguns estudos, em lipossomas, demonstraram que pulsos eléctricos podem causar não só poros membranares mas também deformação lipídica dos lipossomas (Eberhard, *et al.*, 2000). Se os impulsos eléctricos forem de força moderada e de curta duração, a membrana pode por si mesma recuperar a sua estrutura inicial permanecendo viva (Tien e Ottova, 2003).

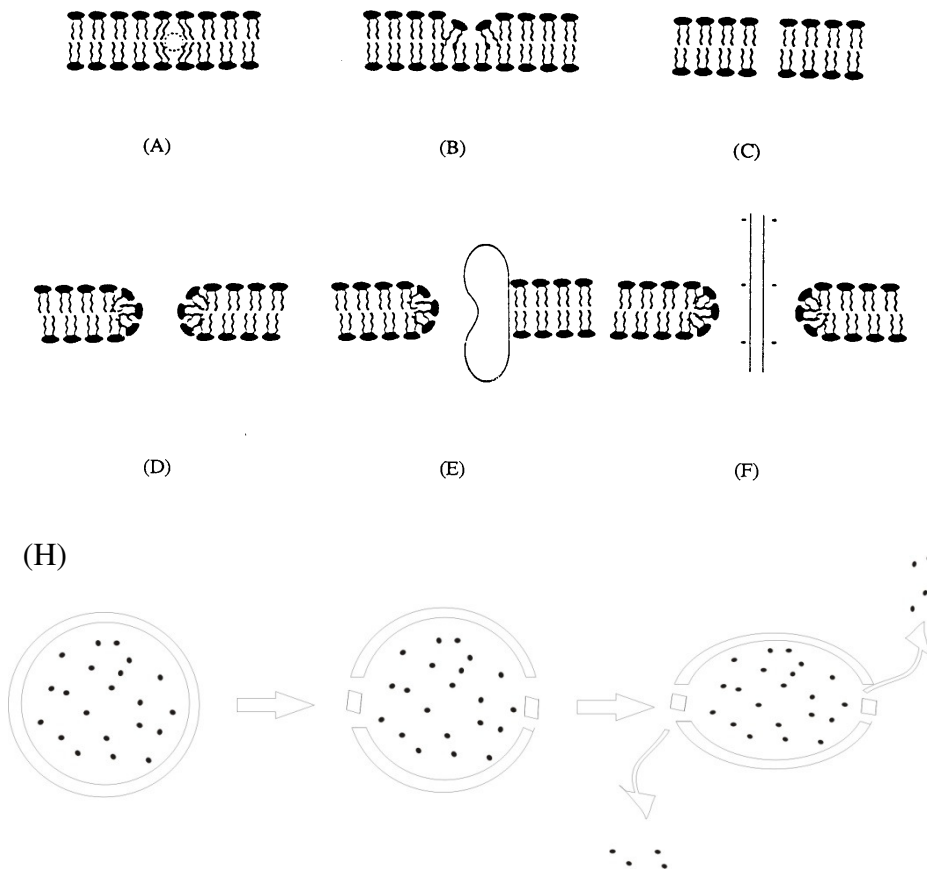


Figura 10: Estado químico específico de transição por rearranjo de moléculas lipídicas constituintes da membrana. A: representa estado biliar inicial do processo eléctrico; B, C e D: alterações que vão decorrendo ao longo da imposição dos pulsos eléctricos as membranas; E e F representam alterações membranares que podem ocorrer junto a proteínas ou canais específicos. H representa a deformação de Maxwell. Adaptado de James, *et al.*, 1992.

Aumentando a dosagem e a duração do campo eléctrico, leva à lise celular e à libertação dos materiais celulares. Numa diminuição do fosso entre os eléctrodos para uma microescala ou focando o campo eléctrico para uma única célula, a aplicação do pulso seria também reduzido para voltagens inferiores a 10V (Lu, *et al.*, 2005).

Vários fenómenos de transporte electroporativo de libertação de componentes citosólicos e captação de substancias externas, como DNA ou drogas, são causadas recentemente por pulsos eléctricos. Salientam-se as alterações à permeabilidade, que contudo, resultam de uma indução à alteração estrutural na membrana. Estas mudanças estruturais podem ser transitórias, ou até de longa duração, formando os sítios de permeabilidade, vias, canais ou poros (Eberhard, *et al.*, 2000).

Aparentemente, a aplicação de pulsos eléctricos externo às células causam polarização iónica interfacial das membranas dieléctricas análogas para condensar cargas (+,-). Nestas alterações dão-se a formação de poros que permitem a passagem de água. Estes poros podem ser poros cilíndricos hidrofóbicos ou poros hidrofílicos invertidos, sendo que estes são assim formados para minimizar o contacto hidrofóbico com a água (Eberhard, *et al.*, 2000).

Vários estudos demonstram que pulsos eléctricos externos causam a electroporação membranar e o alongamento electromecânico da vesícula. O início dessa deformação dá-se rapidamente criando uma forma elipsóide. Nesta fase, designada fase 0, não é visível a libertação de iões. Na fase 0, o volume da célula continua constante. O alongamento é posteriormente possível se, na ausência de formação de vesículas e suas ondulações, a superfície membranar aumente a sua capacidade de electroporação, por aumento de cargas na superfície. Na formação de poros aquosos, a célula aumenta de volume, seguido de um outro passo de perda de volume por eliminação de conteúdo intracelular. A este fenómeno de deformação dá-se o nome de Deformação de Maxwell, demonstrado na figura 10H (Eberhard, *et al.*, 2000).

Quando é realizada a lise celular, o principal problema é a geração de bolhas devido à electrólise da água e aquecimento associados à elevada força necessária (Wang, *et al.*, 2006). Em trabalhos anteriores, a combinação de forças aplicadas de 400V/cm e 500V/cm proporcionam uma força de lise suficiente sem formação de bolhas (MacClain, *et al.*, 2003).

Nos trabalhos desenvolvidos por Wang, *et al.*, 2006, foi desenvolvido um simples dispositivo de lise celular de fluxo contínuo. As células eram lisadas electricamente ao passar num canal estreito, aumentando assim a possibilidade de todas as células serem lisadas neste processo, tornando-o eficaz e rápido. Neste processo não havia necessidade de grande variedade de materiais, necessitando apenas de uma fonte de energia. Desta forma este processo era além de fácil, extremamente económico (Wang, *et al.*, 2006).

Nos ensaios desenvolvidos, o uso da *E. coli* para a lise celular exige um campo eléctrico mais elevado do que exigido pelas células de mamíferos, tornando assim o desafio ainda maior. Além disso as células bacterianas são de menor dimensão (Wang, *et al.*, 2006).

Os resultados demonstraram que houve uma abrupta perda de viabilidade celular com campos eléctricos elevados, cerca de 1000-1500 V/cm. Por estudos de imagiologia, demonstrou-se que a desintegração total da estrutura membranar acontece por volta dos 2000 V/cm, valor inferior ao descrito em trabalhos anteriores, que rondavam os 7000V/cm, mas com menores tempos de exposição. (Wang, *et al.*, 2006).

Foi descoberto neste mesmo estudo que um campo de intensidade inferior a 300V/cm, não afectava a viabilidade celular mesmo com uma exposição de dezenas de segundos.

Wang, *et al.*, 2006, desenvolveram assim um processo simples e de alta utilidade para estudos posteriores de análise química dos materiais intracelulares e para entrega de drogas e genes para o interior das células baseado na electroporação.

1.2.4 - Lise Térmica

A lise eléctrica é um processo baseado em ciclos de temperatura, ou por outras palavras, de congelamento/descongelamento.

É um processo que, relativamente aos processos de lise química, por exemplo na lise alcalina, apresenta algumas vantagens do ponto de vista laboratorial. Apresenta também alguma utilidade na remoção de algumas enzimas digestivas de DNA intracelulares.

Os primeiros desenvolvimentos deste processo apareceram no início dos anos 80, com Holmes e Quigley a desenvolverem um primeiro processo de preparação em microescala de plasmídeos por ciclos de congelamento/descongelamento mas com o uso de lisozima.

O processo era baseado em ciclos de aquecimento, 40s num banho, prosseguidos por um ciclo de congelamento a -18°C durante 10 minutos. Este processo era repetido algumas vezes e finalizado com processos de centrifugação (Holmes e Quigley, 1980).

O uso de temperaturas de 94°C em alguns casos promove a lise celular (Waters, *et al.*, 1998).

Este tipo de processos sofreu modificações passando a ter tempos e temperaturas muito diferentes (Wanarska, *et al.*, 2007).

Inevitavelmente, as desvantagens deste processo são várias. As diferenças de temperatura promovem desnaturação da maioria das biomoléculas, o que inibe a sua utilização em muitos processos de recuperação de várias biomoléculas. Além disso, este processo é aplicável unicamente a microescala, o que não permite a sua utilização industrial, pois para tal os custos aumentariam exponencialmente.

2 – Hipótese e Objectivos

É de grande importância para aplicação na Terapia Génica, uma elevada quantidade de plasmídeos em estado puro.

O processo de lise celular é o primeiro passo pós fermentação, isto é do processo de produção de plasmídeos em bactérias, e este vai interferir em todos os processos de purificação dos plasmídeos que se seguem.

Já existem muitos processos de lise celular descritos, mas sendo este o passo limitante de todos os restantes passos de purificação, torna-se desejável processos mais simples e eficazes para este passo.

O objectivo deste trabalho é o estudo de alguns processos de lise já existentes e a sua respectiva comparação, tendo como hipótese o desenvolvimento de processos de excreção celular dos plasmídeos por parte da bactéria sem lise celular.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Reagentes

3.1.1 – Plasmídeo pVAX1-LacZ

Este plasmídeo (Figura 11) é constituído por 6050 pares de bases, e tem como uma característica a distribuição equilibrada dos pares de bases. Este plasmídeo apresenta, como marca selectiva, o gene resistente à *kanamicina*.

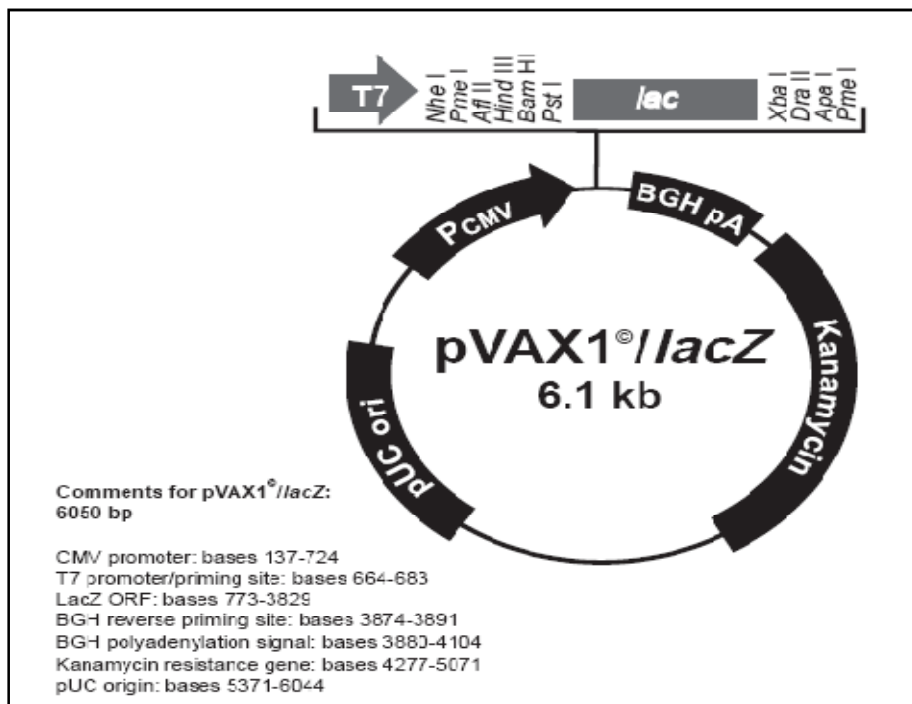


Figura 11 – Modelo estrutural do plasmídeo pVAX1-LacZ

Adaptado de: *Invitrogen life technologies*

3.2 – Meio de Crescimento

As placas de crescimento da estirpe da *E. coli* usadas foram preparadas com a composição seguinte (valores expressos em concentração mássica):

Meio LB (“Luria Broth”) (20 g/L); agár (20 g/L); e Kanamicina (30µg/ml)

Nas etapas de fermentação foi usado o meio de cultura TB (“Terrific Broth”), com a constituição seguinte (valores em percentagem (p/v) e concentração molar):

Tabela 2: Composição do meio TB e respectivas concentrações

	Composição	Concentração
Meio TB	Dihidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	17 mM
	Hidrogenofosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	72 mM
	Glicerol	55 mM
	Triptona	1,12% (m/v)
	Extracto de levedura	2,4% (m/v)

De modo a garantir condições estéreis de crescimento do microrganismo *E. coli* DH5α, os meios, balões e todos os restantes acessórios necessários a estas experiências foram esterilizados por autoclavagem, excepcionando a solução de minerais, da solução de complemento e do antibiótico (*kanamicina*).

Todas as adições dos constituintes filtrados ou autoclavados separadamente dos meios foram realizadas à chama, bem como as manipulações do microrganismo (inoculação e recolha das amostras), de forma a manter a esterilidade do meio de fermentação.

3.3 – Marcador de Pesos Moleculares

No processo de electroforese é usado um marcador de pesos moleculares que serve de referência de migração aos outros compostos em análise.

O marcador usado laboratorialmente é de 1kb plus DNA *ladder* fornecido por *Gilbco BRL Markers and Standards*. Os pesos moleculares presentes no marcador são vários: 12000, 5000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200 e 100 pb.

3.4 – Outros Reagentes

Todas as soluções preparadas laboratorialmente foram preparadas com água destilada Millipore.

A lista seguinte (tabela 3 e 4) especifica os restantes reagentes utilizados para este trabalho.

Tabela 3- Reagentes usados ao longo do trabalho e suas características.

Reagente	Grau de pureza	Fornecedor
D (+) - Glucose	≥ 99,5%	Sigma
Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)	≥ 99,5%	Riedel-de-Haën
Etilenodiaminatetra-ácido acético (EDTA)	≥ 99%	Sigma
Hidróxido de sódio	≥ 98%	Sigma
Acetato de potássio	≥ 99%	Sigma
Ácido acético glacial		Merck
Isopropanol		Sigma-Aldrich
Sulfato de amónio	≥ 99%	Sigma
Agarose		Eurobio
Glicerol	≥ 99%	Sigma
Brometo de etídeo		Amresco
Azul de bromofenol		Amresco
Etanol absoluto		Panreac
Acetilacetona	> 99%	Merck

Reagente	Grau de pureza	Fornecedor
LB Agar		USB
LB broth		USB
Sulfato de kanamicina		Amresco
Dihidrogenofosfato de potássio anidro	> 99%	Riedel-de-Haën
Hidrogenofosfato de potássio anidro	> 99%	Sigma
Hidrogenofosfato de sódio	> 99%	Sigma
Cloreto de sódio		Panreac
Citrato de potássio monohidratado	> 99%	Sigma
Citrato de sódio dihidratado	> 99%	Sigma
Sulfato de amónio	≥ 99%	Sigma
Extracto de levedura		Sigma
Triptona		Oxoid
D (+) –Glucose	≥ 99,5%	Sigma
Glicerol	≥ 99%	Sigma
Ácido clorídrico	37%	Panreac

Tabela 4 – Reagentes utilizados para controlo de pH, controlo de espuma e para calibração do eléctrodo de pH.

Reagente	Grau de pureza	Fornecedor
Ácido sulfúrico	98%	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	≥ 98%	Sigma
Silicone	Industrial	Dow Corning
Tampão pH=4,00		Riedel-de-Haën
Tampão pH=7,00		Riedel-de-Haën

3.5 – Equipamentos diversos

Os equipamentos gerais utilizados foram:

- Agitador Vórtice Heidolph Reax 2000;
- Autoclave Uniclave 88;
- Balança analítica Metler PJ300;
- Banho termostaticado;
- Centrífuga Hermula Z232K
- Centrífuga Sigma, modelo 3k 18C;
- Eléctrodo de pH, Metler, Metrohm;
- Espectrofotómetro Ultrospec, modelo U/V-3000 da Pharmacia Biotech;
- Estufa;
- GW – Laboratory DC Power Supply; Model GPS-3030D
- HPLC, Sistema de cromatografia a alta pressão Waters 600 (Controller & Pump) e Waters 2996 (Detector). Programa informático Empower Pro 2002.
- Incubador Orbital Aralab 160E (350 rpm);
- Placas de aquecimento e agitação magnética P.Selecta Agimatic-E;
- Sistema de electroforese Biorad Mini-sub cell GT e Wide mini-sub cell GT. A visualização do gel é por Vilber Lourmat, com câmara CV-A50C. O software utilizado era Biocat MW 10.02 e BIO-1D 99.04;

4 - Protocolo Experimental

4.1 – Esterilização de Meios e Equipamentos

Todo o processo de crescimento da bactéria recombinante *E.coli* DH5 α tem em comum a necessidade de ter de ocorrer em condições altamente estéreis.

Para que o crescimento bacteriano ocorra de forma específica, ou seja, que não ocorra nenhum tipo de contaminação, todos os meios de crescimentos e materiais usados, desde o plaqueamento à fermentação, foram esterilizados por autoclave (15 minutos a 121°C e pressão de 1 atm).

Além disso, todos os procedimentos de plaqueamento, inoculação e recolha de amostras do meio de cultura foram efectuados à chama de forma a prevenir a contaminação do meio.

4.2 – Fermentação

A maioria dos estudos laboratoriais usa multicópias de plasmídeos do tipo ColE1 como base da terapia génica ou construção de vacinas e promovem a sua replicação na *Escherichia coli* (Adbelnoor, 2001). Neste trabalho foi usado como plasmídeo a pVAX1- LacZ em *E.coli* DH5 α (figura 12).

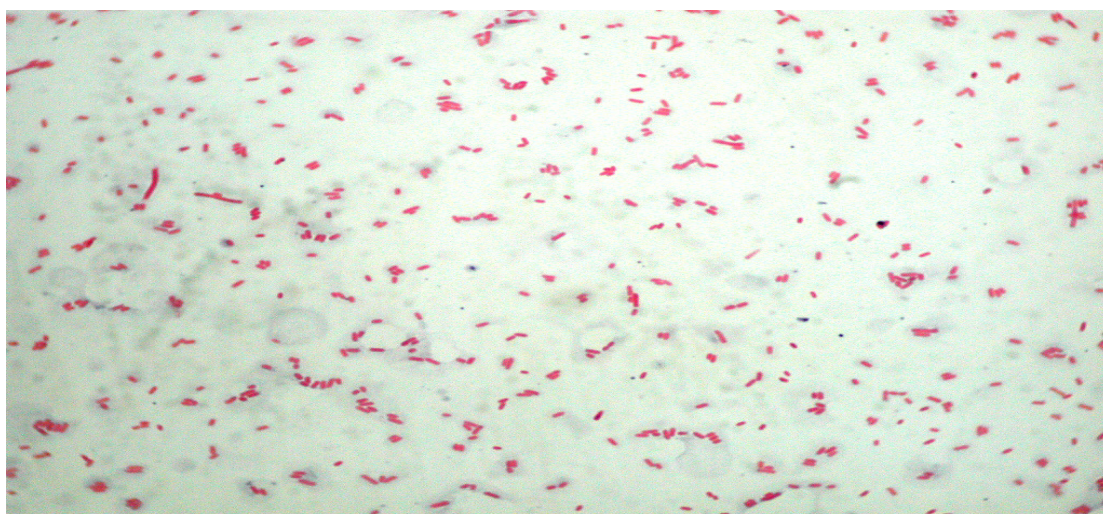


Figura 12 – Fotografia ao microscópio óptico composto (1000x) de uma suspensão celular resultante de uma fermentação à temperatura de 30°C. Coloração de Gram da *E.coli* DH5 α .

O processo de fermentação tem um passo básico prévio antes da inoculação no meio de cultura.

O processo inicia-se pela inoculação de placas com meio sólido LB (20g/L) e agár (20 g/L) com 30 µg/L de Kanamicina.

O crescimento é feito durante a noite numa estufa a 37°C até se visualizarem as colónias a olho nú.

Posteriormente elabora-se uma pré-fermentação e depois a fermentação.

A inoculação da *E. coli* DH5α transformadas com o plasmídeo pretendido, para a pré-fermentação, é feita num meio de 62,5 ml de TB, num balão de 250 ml com 30 µL de Kanamicina.

O crescimento da pré-fermentação foi levado a cabo até ser atingida a DO₆₀₀ necessária para inocular o meio de fermentação para que a DO₆₀₀ inicial deste seja de, aproximadamente, 0,2. O volume de pré-fermentação necessário para inocular a fermentação é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$DO_{\text{pré-fermentação}} \times \text{Volume}_{\text{pré-fermentação}} = (\text{Volume}_{\text{pré-fermentação}} + \text{Volume}_{\text{fermentação}}) \times DO_{\text{fermentação}}$$

Durante a fermentação, o valor de densidade óptica estabiliza numa dada altura, o que significa que a bactéria está em fase estacionária de crescimento, antes de entrar na fase de morte ou declínio. Significa que está na fase ideal para finalizar a fermentação.

As células foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 5445xg, durante 40 minutos à temperatura de 4 °C, sendo o sobrenadante eliminado e o *pellet* de células foi conservado a -20 °C.

4.3 – Recuperação Celular

O processo seguinte corresponde à recuperação celular do meio de fermentação por ultrafiltração ou centrifugação, técnicas mais usadas. A ressuspensão das células concentradas num tampão apropriado, leva a que sejam preparadas para o seguinte passo, lise celular, e posterior libertação do plasmídeo. O tampão geralmente contém agentes que quebram ligações iónicas e de hidrogénio entre lípidos e/ou proteínas; um dos compostos mais utilizados como agente quelante é etileno diamina tetra-ácido acético (EDTA).

A remoção de catiões divalentes (maioritariamente Ca^{2+} e Mg^{2+}) da parede celular, membrana externa (em bactérias Gram-negativas como a *E.coli*) e membrana plasmática, destabiliza a sua estrutura, facilitando o processo de lise e reduzindo a actividade de nucleases endógenas dependentes de Mg^{2+} , prevenindo a degradação do plasmídeo (Diogo *et al.*, 1999).

4.4 – Lise celular, clarificação e concentração

4.4.1 - Lise Alcalina

O processo de lise alcalina é seguido pelo protocolo elaborado por *Birnboim and Doly* (1979), mas com algumas alterações:

- 1- Adicionar 20 ml de tampão P1 (50mM glucose, 25mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0), tampão de ressuspensão após o passo final de armazenamento pós-fermentação;
- 2- Adicionar de 20 ml de tampão P2 (200 mM NaOH, 1 % (p/v) SDS) e posteriormente agitar por inversão;
- 3- Incubar 5 minutos à temperatura ambiente para desnaturação de gDNA;
- 4- Adicionar 16 ml do tampão P3 (Acetato de potássio 3M, pH 5,0) e posteriormente homogeneizar por inversão.
- 5- Incubar 15 em gelo.
- 6- Centrifugar a 20000g durante 30 minutos a 4°C.
- 7- Centrifugar novamente o sobrenadante a 20000g durante 15 minutos a 4°C.
- 8- Adicionar Isopropanol para precipitação do pDNA na proporção de 0,7 volumes.
- 9- Centrifugar a 20000g durante 30 minutos a 4°C.
- 10- Obter o pellet e deixar secar ao ar livre.
- 11- Ressuspender em Tris 2,5 M, pH 8,0.
- 12- Adicionar Sulfato de Amónio para uma concentração final de 2,5M, promovendo a precipitação de proteínas.
- 13- Agitar, incubar em gelo 15 minutos e posteriormente centrifugar a 10000g durante 20 minutos.

4.4.2 - Lise Osmótica

Este processo foi baseado no processo descrito por *Neu and Heppel (1965)*, mas com as alterações que foram sendo feitas ao longo dos tempos. O protocolo descrito de seguida foi retirado de *Jazii, et al. (2007)*.

- 1- Após o processo de fermentação, centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos à temperatura de 4°C e congelar a -4°C se necessário armazenar.
- 2- Ressuspender as células em 15 ml de tampão TES (0,2M Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 0,5 M Sucrose).
- 3- Misturar e agitar durante 20 minutos com a ajuda de um agitador de rolos.
- 4- Promover Choque Osmótico com 22,5 ml de água fria contendo 2 mM de MgCl₂ e 1 mM PMSF.
- 5- Incubar em gelo durante 30 minutos.
- 6- Centrifugar a 20000 rpm durante 25 minutos.
- 7- Adicionar Isopropanol para precipitação do pDNA na proporção de 0,7 volumes.
- 8- Centrifugar a 20000g durante 30 minutos a 4°C.
- 9- Obter o pellet e deixar secar ao ar livre.
- 10- Ressuspender em Tris 2,5 M, pH 8,0.
- 11- Adicionar Sulfato de Amónio para uma concentração final de 2,5M, promovendo a precipitação de proteínas.
- 12- Agitar, incubar em gelo 15 minutos e posteriormente centrifugar a 10000g durante 20 minutos.

4.4.3 - Lise Térmica

O processo de lise térmica desenvolvido por *Holmes and Quigley* (1980) trata-se de um processo enzimático. Este processo foi utilizado de forma não enzimática neste trabalho, baseando-se então apenas em ciclos de temperatura.

- 1- Após o processo de fermentação, centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos à temperatura de 4°C e congelar a -4°C se necessário armazenar.
- 2- Ressuspender as células em 20 ml de tampão STET (50 mM de EDTA em Tris 50 mM, pH 8,0)
- 3- Iniciar os ciclos de temperatura: 40 s a 1 minuto em banho de água à temperatura de 42 °C; seguido de congelamento em azoto líquido (-196°C).
- 4- Repetir o ciclo as vezes necessárias.
- 5- Centrifugar durante 10 minutos a 12000g à temperatura de 4°C.
- 6- Adicionar Isopropanol para precipitação do pDNA na proporção de 0,7 volumes.
- 7- Centrifugar a 20000g durante 30 minutos a 4°C.
- 8- Obter o pellet e deixar secar ao ar livre.
- 9- Ressuspender em Tris 2,5 M, pH 8,0.
- 10- Adicionar Sulfato de Amónio para uma concentração final de 2,5M, promovendo a precipitação de proteínas.
- 11- Agitar, incubar em gelo 15 minutos e posteriormente centrifugar a 10000g durante 20 minutos.

4.4.4 - Lise Eléctrica

Estes processos não são descritos de forma geral na literatura científica existente. Todo este processo foi inicializado e padronizado durante o trabalho realizado no CICS.

- 1- Após o processo de fermentação, centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos à temperatura de 4°C e congelar a -4°C se necessário armazenar.
- 2- Ressuspender as células em 20 ml de tampão fosfato (0,1 M de tampão fosfato, 0,01 M EDTA, 0,01 M NaCl, pH 8,0)
- 3- Colocar os eléctrodos no copo com a solução e ligar o sistema.
- 4- Centrifugar durante 20 minutos a 16000g para precipitar os restos celulares.
- 5- Adicionar Isopropanol para precipitação do pDNA na proporção de 0,7 volumes.
- 6- Centrifugar a 20000g durante 30 minutos a 4°C.
- 7- Obter o pellet e deixar secar ao ar livre.
- 8- Ressuspender em Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.

4.4.5 - Lise Alcalina com tampão arginina

Este novo processo baseia-se no processo de lise alcalina elaborado por *Birnboim and Doly (1979)*, alterando o protocolo anteriormente descrito no tampão P2.

- 1- Adicionar 20 ml de tampão P1 (50mM glucose, 25mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0), tampão de ressuspensão após o passo final de armazenamento pós-fermentação;
- 2- Adicionar de 20 ml de tampão P2 (0,5 M l-arginina, pH 11,7; 1 % (p/v) SDS) e posteriormente agitar por inversão;
- 3- Incubar 5 minutos à temperatura ambiente para desnaturação de gDNA;
- 4- Adicionar 16 ml do tampão P3 (Acetato de potássio 3M, pH 5,0) e posteriormente homogeneizar por inversão.
- 5- Incubar 15 em gelo.
- 6- Centrifugar a 20000g durante 30 minutos a 4°C.
- 7- Centrifugar novamente o sobrenadante a 20000g durante 15 minutos a 4°C.
- 8- Adicionar Isopropanol para precipitação do pDNA na proporção de 0,7 volumes.
- 9- Centrifugar a 20000g durante 30 minutos a 4°C.
- 10- Obter o pellet e deixar secar ao ar livre.
- 11- Ressuspender em Tris 2,5 M, pH 8,0.
- 12- Adicionar Sulfato de Amónio para uma concentração final de 2,5M, promovendo a precipitação de proteínas.
- 13- Agitar, incubar em gelo 15 minutos e posteriormente centrifugar a 10000g durante 20 minutos.

4.5 – Electroforese em gel de agarose

As amostras foram analisadas por electroforese horizontal, usando géis de agarose com composição de 0,8-1% em tampão TAE (40 mM de Tris-Base, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA, pH 8,0), corados com uma solução de 0,5 µg/mL de brometo de etídeo.

A cada amostra adicionou-se *loading Tampão* (30% de glicerol, 0,25% de bromofenol em água destilada). As electroforeses correram a 110 V.

A amostra final recolhida pode ser identificada por electroforese e quantificados espectrofotométricamente.

A electroforese corre em géis de agarose, são corridos em unidades horizontais da Biorad, com uma fonte de alimentação da Biorad. Os géis são posteriormente visualizados sob luz ultravioleta e fotografados usando o sistema de imagem da marca Vilber Lourmat, com uma câmara acoplada, modelo CV-A50C. Utiliza-se ainda o software BIOCAPT para tratamento das imagens resultantes da electroforese em gel de agarose.

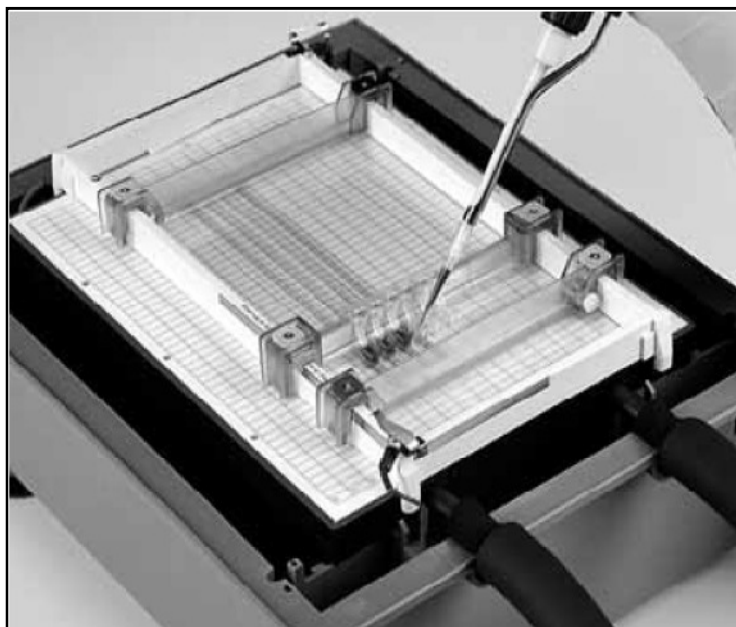


Figura 13 – Exemplo de uma preparação de uma electroforese.

Adaptado de Amersham Handbook, 2004.

4.6 – Determinação da Concentração de DNA plasmídico na solução de lise por HPLC.

A concentração de DNA plasmídico foi determinada por HPLC usando cromatografia de interacção hidrofóbica, como descrito por Sousa *et al.* (2006)

A coluna de HIC empacotada com a resina Phenyl-Sepharose ligada ao sistema de HPLC foi equilibrada com um tampão contendo sulfato de amónio 1,5 M em Tris-Cl 10 mM a pH 8,0 (solução previamente filtrada e sonicada durante aproximadamente 10 min). O volume de injeção usado foi de 20 µL e o caudal de eluição de 1mL/min. Todas as isoformas de plasmídeo (linear, cadeia aberta e superenrolado) são eluídas da coluna nos primeiros 0,8 min de operação, quando a concentração de sal é de 1,5 M. Após 2 min do início da operação, a concentração de sulfato de amónio decresce instantaneamente para 0 M (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0) e assim permanece durante 5 min de forma a garantir a eluição das espécies ligadas à coluna. Para se iniciar um novo ciclo, a coluna é novamente equilibrada com sulfato de amónio 1,5 M durante 8 min. De salientar que, a absorvância registada foi de 254 nm e para todas as amostras foram realizados duplicados.

Para a realização da curva de calibração, apresentada na figura 14, foram preparadas soluções padrão de plasmídeo pVAX1-LacZ com concentrações que variam entre 0,5 e 50 µg/mL (determinadas pela medida da absorvância a 260 nm).

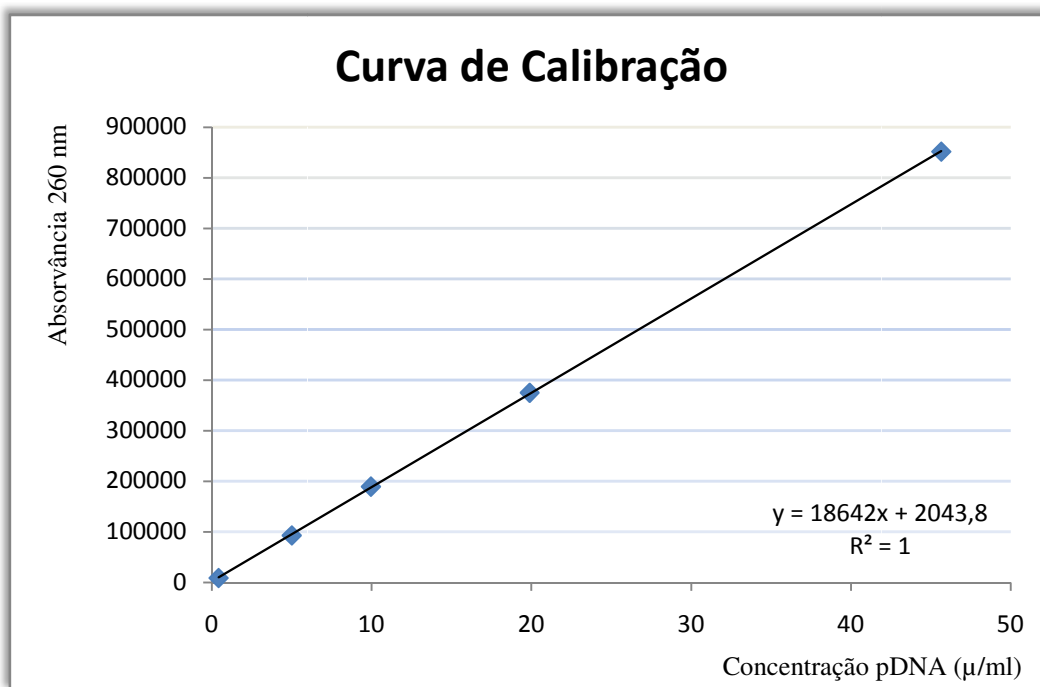


Figura 14 – Curva de calibração da área do pico em função da concentração de plasmídico pVAX1-LacZ.

Obteve-se a seguinte correlação:

$$\text{Área do pico } (\mu V.s) = 18642[\text{pVAX1-LacZ}](\text{mg/l}) + 20438$$

com o seguinte coeficiente de correlação (r^2): 1

As análises de HPLC, para além de permitirem a determinação da concentração em plasmídeo, possibilitam o cálculo da percentagem da área total correspondente ao pico de DNA plasmídeo, como medida do grau de pureza da amostra. Os cromatogramas obtidos por HPLC mostram sempre um pico inicial de DNA plasmídico seguido de vários picos, correspondentes às várias impurezas presentes na amostra (RNA, proteínas, entre outras) (Sousa *et al.*, 2006).

5 - Resultados e Discussão

5.1 – Fermentação

A distribuição natural ao acaso das multicópias de plasmídeos tal como a divisão celular, garantem usualmente alta estabilidade segregativa. Contudo, inúmeras observações indicam que as multicópias sintéticas de plasmídeos são usualmente perdidas em alta percentagem em condições não selectivas.

Por esta razão, um marcador selectivo, isto é, um antibiótico que funciona como marcador, é usualmente incluído para criar selectividade em relação a outras formas predominantes de plasmídeo livre nas células, que poderiam aparecer durante o crescimento (Passarinha *et al.*, 2006; Adebelloor, 2001).

O uso de plasmídeos de elevado número de cópias, juntamente com uma adequada escolha das condições selectivas usadas para o crescimento das células de *E. coli*, pode aumentar a produção de plasmídeos.

O processo de cultivo para produção de pDNA deve ser seleccionado e optimizado não apenas com base na produção de plasmídeos, mas também no impacto que as condições de cultura possam ter no processo seguinte de recuperação (Passarinha *et al.*, 2006).

Após a inoculação em placas e devido ao crescimento em estufa a 37°C *overnight*, promoveu-se a inoculação no meio de pré-fermentação (volume de 62,5 mL com a composição já descrita anteriormente).

Os processos de pré-fermentação e fermentação foram efectuados a uma temperatura de 37°C e uma agitação de 250 rpm.

O processo de desenvolvimento foi seguido por leituras de densidade óptica (DO) de hora a hora até uma densidade óptica próxima de 2,6 (tabela 5).

Tabela 5 – Resultados de DO a 600nm ao longo das horas em pré-fermentação

<i>Tempo (horas)</i>	<i>DO (600 nm)</i>
1	0,520
2	0,891
3	2,14
3,5	2,78

Posteriormente procedeu-se ao cálculo do volume necessário à inoculação no meio de fermentação. O valor de DO pretendido para iniciar o processo de fermentação era de 0,2, o que pela fórmula da DO se retira o volume a inocular:

$$DO_{\text{pré-fermentação}} \times \text{Volume}_{\text{pré-fermentação}} = (\text{Volume}_{\text{pré-fermentação}} + \text{Volume}_{\text{fermentação}}) \times DO_{\text{fermentação}}$$

$$V = 19,14 \text{ mL}$$

Quando as células microbianas são inoculadas numa fermentação em “batch” que contém meio de cultura fresco e o aumento da concentração de células é monitorizado através de DO, podem ser observadas várias fases de crescimento

Existe uma fase de latência (fase “lag”) inicial, cuja duração é variável. Esta fase é seguida pela fase de crescimento exponencial, onde o número de células (e peso seco) aumenta exponencialmente. Esta fase também é designada por fase logarítmica, que advém do facto de se representar graficamente o logaritmo do número de células em função do tempo. Seguidamente, existe uma pequena fase de desaceleração, onde o número de células é o mais elevado. Finalmente, o número de células sofre uma redução durante a fase de morte ou de declínio (Blanch e Clark, 1996).

A curva de crescimento típica de uma população bacteriana numa cultura descontínua tem o aspecto da figura 15.

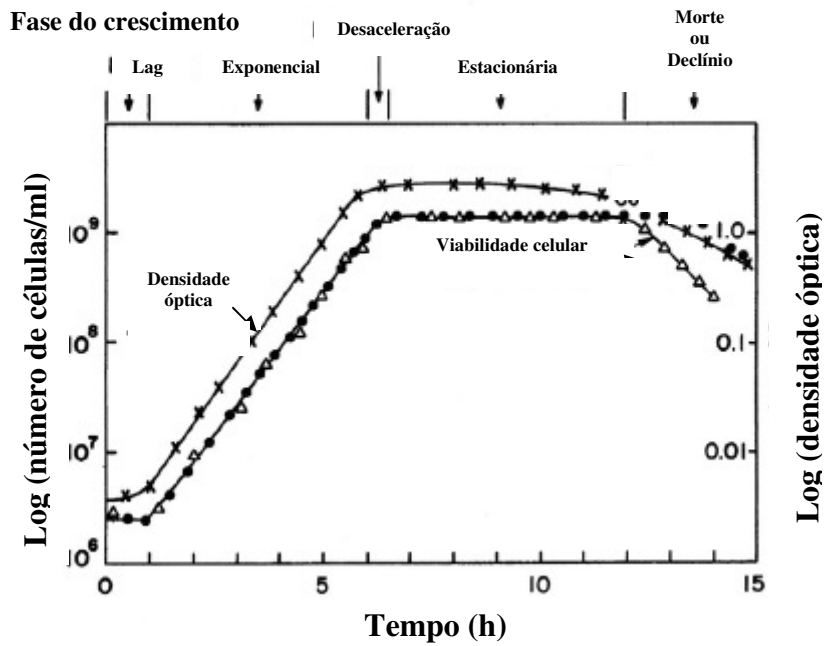


Figura 15 – Curva de crescimento típica para uma população bacteriana numa cultura descontínua. Adaptado de: www.chemeng.mcmaster.ca/courses/che3bk3/Lecture%208.pdf

Após a inoculação, o processo de crescimento foi seguido novamente por densidade óptica (DO), representa do na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados de DO ao longo das horas na fermentação

<i>Tempo (horas)</i>	<i>DO (600nm)</i>
0	0,240
1	0,416
2	0,995
3	2,68
4	4,09
5	4,49
6	4,78
7	5,38
8	5,97

A curva de crescimento bacteriano obtida na fermentação é apresentada na figura 16:

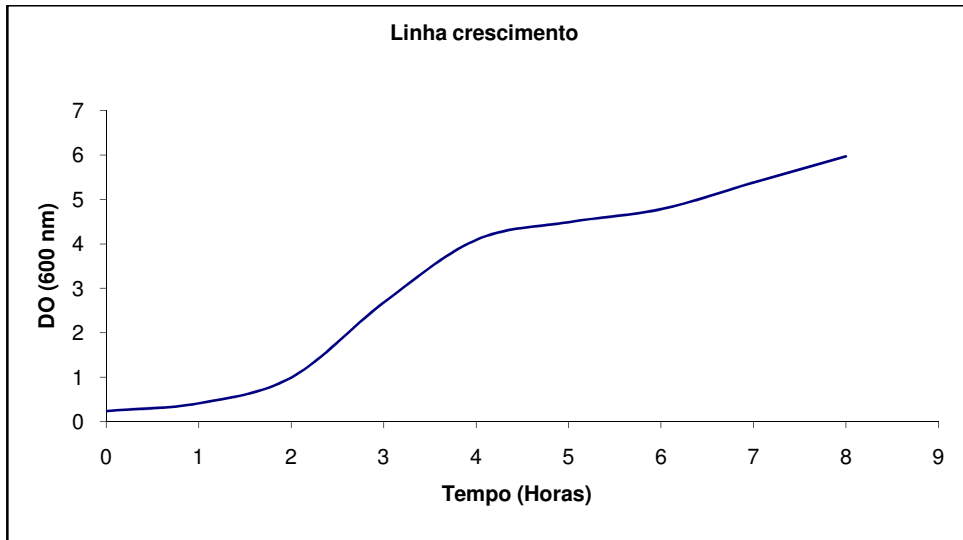


Figura 16 – Curva de crescimento da *E. coli* DH5 α transformada com o plasmídeo pVAX1-LacZ em balão com meio de crescimento TB

A fermentação terminou à oitava hora, altura do qual o crescimento estava numa fase estacionária.

O processo é seguido por uma centrifugação e congelamento a -20°C de forma a guardar as células para a etapa seguinte de lise celular.

Este processo foi repetido tantas vezes quantas as necessárias para obter células suficientes para a realização de todos os ensaios laboratoriais.

5.2 – Lise Celular

A lise celular é o primeiro processo pós fermentação e este mesmo influencia todos os processos seguintes de purificação. Os processos foram seguidos de forma rigorosa em relação ao descrito na bibliografia científica e os novos processos desenvolvidos foram otimizados da forma possível em relação ao material disponível no laboratório.

Todos os processos ao longo do trabalho foram controlados por electroforese, quer as amostras recolhidas durante os ensaios, tal como as amostras iniciais.

A electroforese é um processo analítico que permite visualizar os componentes da amostra em questão por diferentes propriedades.

Esta técnica permite a separação das biomoléculas da amostra em estudo por diferentes velocidades de migração perante um gel que é submetido a uma corrente eléctrica (Amersham Handbook). O tamanho do gel vai levar a maior ou menor velocidade de migração, e como cada biomolécula tem os seus pesos moleculares e tamanhos específicos, vão migrar de forma diferente, promovendo assim à distinção dos componentes em solução.

A concentração de DNA plasmídico foi determinada por HPLC, usando cromatografia de interacção hidrofóbica, como descrito por Sousa *et al.*, 2006, numa coluna HIC empacotada com a resina Phenyl-Sepharose.

5.2.1 – Lise Alcalina

A lise alcalina foi seguida conforme descrito anteriormente.

Este processo foi seguido como padrão, por ser o processo mais usual a nível laboratorial para recuperação de DNA plasmídico. Trata-se de um processo rápido, versátil e eficaz promovendo a despistagem de muitos dos contaminantes de uma amostra final de DNA plasmídico, permitindo obter uma quantidade de mais pura e restringindo o método enzimático.

O processo permite obter DNA plasmídico, com baixo número de contaminantes, devido às suas propriedades específicas que lhe conferem estabilidade durante o pH elevado (12,0-12,5) do processo. Os contaminantes finais são de baixo peso molecular, tal como RNA e DNA linear.

Este processo promove a lise completa com o uso de SDS e NaOH, permitindo obter então o elevado valor de pH. O uso da glucose permite também um controlo do pH. Após o valor elevado de pH, o processo segue com uma renaturação de DNA, com o uso de acetato de potássio, que permite a neutralização da solução. A renaturação do DNA linear acontece sobre forma de agregados insolúveis, que posteriormente precipita. Simultaneamente o acetato de potássio em alta concentração promove a formação de complexos proteína-SDS que permitem a sua precipitação, tal como RNA de elevado peso molecular, evitando assim estes contaminantes. Desta forma os contaminantes macromoléculares estão co-precipitados e são removidos facilmente por centrifugação.

Os resultados da figura 17 demonstram uma electroforese padrão do processo de lise alcalina.

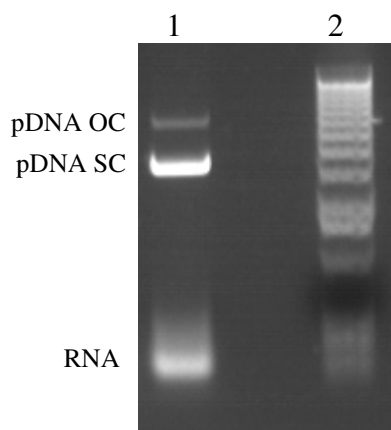


Figura 17: Electroforese relativa a uma lise alcalina. Legenda: 1 – Lise Alcalina; 2- Marcador.

Este ensaio mostra elevado teor de DNA plasmídico na isoforma superenrolada, a isoforma em maior quantidade no interior da bactéria e, também, exigida pelas agências reguladoras, e baixo teor da isoforma de cadeia aberta.

Os restantes contaminantes, restos de gDNA e RNA de baixo peso molecular ainda se encontram, sendo necessários processos de purificação seguintes como cromatografia de interacção hidrofóbica ou outros.

Relativamente à quantificação, este processo apresentou o cromatograma da figura 18:

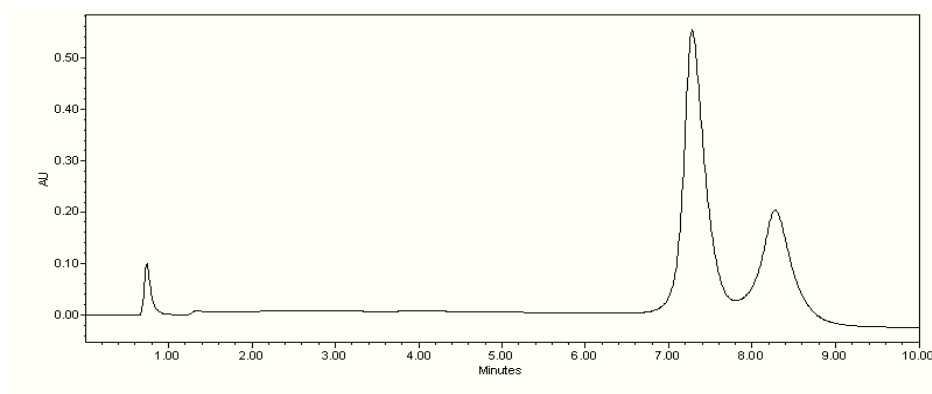


Figura 18: Cromatograma relativo ao processo de quantificação de pDNA em HPLC. Pico 1: pDNA; Pico 2 e 3: contaminantes.

O valor de concentração de DNA plasmídico deste processo foi de 30,363 µg/ml, sendo este valor considerado como padrão para os seguintes ensaios.

Todos os outros ensaios foram quantificados da mesma forma.

5.2.2 – Lise por Choque Osmótico

Trata-se de um processo que permite o rompimento da parede celular, sem alterar a estrutura da membrana celular. Sendo um processo usado principalmente para proteínas e biomoléculas específicas do espaço periplasmático, evitando a contaminação de material intracelular. A possível existência de plasmídeos no espaço periplasmático leva ao interesse no seu estudo, devido ao seu elevado tamanho e também ao facto de não possuir nenhum tipo de marcação específica como as proteínas para a sua passagem para o periplasma.

O objectivo deste ensaio seria verificar a existência do plasmídeo no espaço periplasmático e obtê-lo. O processo de lise por choque osmótico foi seguido conforme descrito anteriormente.

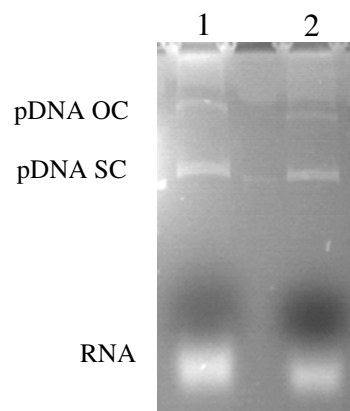


Figura 19: Electroforese relativa a uma lise osmótica. Legenda: 1 - Protocolo normal; 2- Repetição do protocolo nas mesmas células do ponto 1.

Os resultados obtidos e representados na figura 19 demonstram a existência de plasmídeo no espaço periplasmático, mas em baixo valor, tal como comprova a quantificação elaborada em HPLC, com um valor inferior a 0,5 µg/ml.

Verificou-se também se uma repetição do processo sobre as mesmas células poderia ser útil para a lise total das bactérias. Esta repetição comprova que este tipo de lise serve unicamente para romper a parede e não a membrana celular. Sobre estes resultados não se pode definir este método como vantajoso para recuperação de plasmídeos, pois o seu baixo teor no periplasma não é suficiente para o pretendido.

5.2.3 – Lise por Choque Térmico

Este processo é descrito na bibliografia científica como um processo enzimático. O objectivo do trabalho era desenvolver processos económicos e rápidos, e os processos enzimáticos são sempre mais dispendiosos que os não enzimáticos. É também um processo muito usado a nível proteico, sendo algumas proteínas menos susceptíveis a desnaturação por diferenças térmicas tão elevadas.

Trata-se de um processo útil em microescala, rápido e eficaz, mas que promove desnaturação a muitas das biomoléculas presentes no interior da célula.

O estudo foi baseado em número de ciclos efectuado e em diferentes temperaturas. O processo foi baseado no protocolo anteriormente descrito.

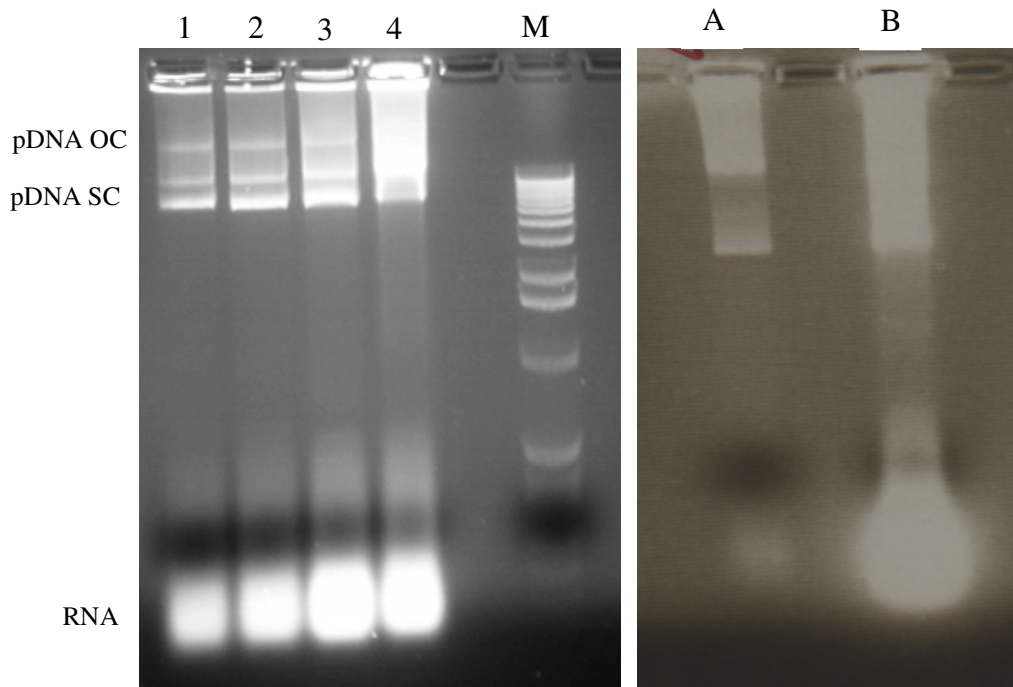


Figura 20: Lise Térmica por comparação de número de Ciclos de 42°C-Azoto líquido (DO:6,2).
Legenda: 1- 1 Ciclo; 2- 3 Ciclos; 3- 5 Ciclos; 4 – 9 ciclos; M- Marcador; A – 7 ciclos de 40°C-
Azoto líquido; B – 7 ciclos de 32°C – Azoto líquido

Estes ensaios demonstram ser possível lisar a célula não enzimaticamente, como representa a figura 20. O aumento de ciclos promove um aumento de células lisadas e por sua vez aumento de DNA plasmídico libertado. No entanto um número de ciclos elevado promove desnaturação do DNA plasmídico.

Os resultados de quantificação apresentam valores de pDNA superiores de ciclo para ciclo, ou seja, um aumento de ciclos permite um aumento de lise e por sua vez maior recuperação de pDNA.

Tabela 7: Valores de concentração de pDNA no processo de quantificação por HPLC. Valor do primeiro ciclo desprezável por se encontrar fora dos valores da curva de calibração.

Número de ciclos	Concentração de pDNA ($\mu\text{g/ml}$)
1	0,12092
3	0,24459
5	0,42295
9	0,46570

No entanto, a electroforese da figura 19 A demonstra a elevada desnaturação do pDNA a partir do segundo ciclo. Quanto mais tempo em banho, na temperatura de descongelamento, menos rentável é o ensaio, tal como na figura 19 B é demonstrado. Demonstra-se também que para processos mais rápidos e menor número de ciclos já se torna mais rentável, como se visualiza na figura 19 A.

Comparando o processo com a lise alcalina, este processo é mais rápido, aplicando apenas a micro escala, mais económico mas menos rentável do ponto de vista de recuperação de pDNA na isoforma superenrolada, pois o aumento da temperatura promove um a diminuição de pDNA superenrolado e aumento de pDNA de cadeia aberta, tal como explicado na bibliografia científica (Sousa, 2006) e para valores de temperatura tão elevados promove a desnaturação de todo o material genómico presente.

5.2.4 – Lise Eléctrica

Foram já descritos diversos ensaios tendo como base o processo de electroporação. Estes demonstram a utilização de voltagem para obtenção de lise celular como método de recuperação para diferentes tipos de biomoléculas (Wang, *et al.*, 2006).

A utilização da voltagem permite a reorientação dos lípidos membranares, levando, eventualmente, à abertura de poros membranares, pelos quais é possível a saída de conteúdo intracelular. Assim sendo, este processo foi testado tendo como objectivo a recuperação de DNA plasmídico.

O processo de lise eléctrica foi seguido pelo protocolo descrito anteriormente, alternando valores de voltagem, tempo, DO e agitação para estudos de alterações e padronização do processo.

- Ensaio relativos à voltagem.

Os primeiros ensaios visavam definir uma gama de valores de voltagem a usar. Valores elevados de voltagem promoviam lise rápida mas também elevada temperatura, que promovia desnaturação de DNA plasmídico. Os primeiros valores a apresentarem resultados apreciáveis colocavam-se perto dos 10 V/cm, como demonstrado na figura 20.

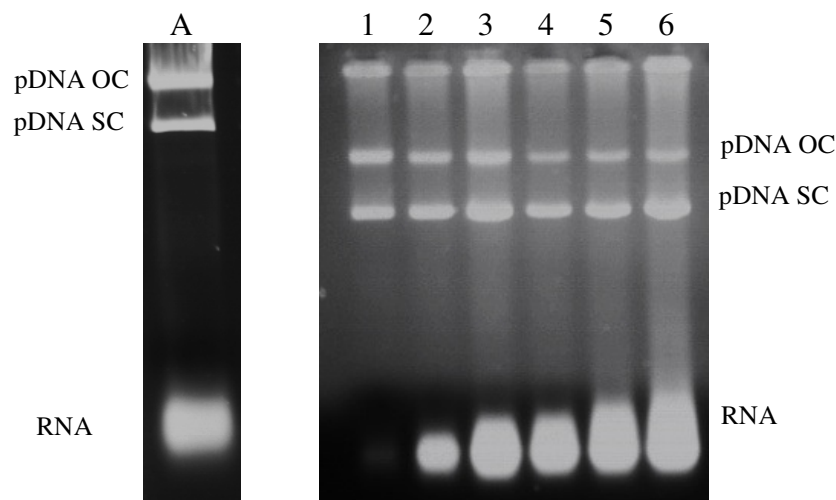


Figura 21: Ensaio de Lise eléctrica, com corrente constante a **5 e 10V/cm**, DO: 10; Agitação: 500 rpm, e arrefecimento em gelo. Legenda: A- 5min a 10 V/cm; 1- 5min., 2- 10 min., 3- 15 min., 4- 20 min., 5- 25 min., 6- 30 min.

Estes demonstram, então, a possibilidade de lise celular, comprovando assim a hipótese proposta. Posteriormente, outros ensaios mostraram ser possível obter o DNA plasmídico sem rompimento completo da célula, figura 21, quando as células eram submetidas a pequenas cargas num curto espaço de tempo, evitando assim a contaminação com o material intracelular. Estes ensaios foram posteriormente desenvolvidos de forma padronizar o processo a uma voltagem de 5V/cm. Os resultados demonstram a obtenção de pDNA, em proporção idêntica nas isoformas de cadeia aberta e superenrolado, sem contaminação intracelular antes dos 5 minutos.

Após 10 minutos as células já se encontram maioritariamente lisadas, como se observa pela presença de RNA na electroforese representada na figura 21.

O passo de quantificação permitiu verificar um aumento de DNA plasmídico desde os primeiros 5 minutos, aumentando o seu valor consoante o aumento de lise celular. No entanto, os primeiros 5 minutos apresentam um valor de contaminantes muito inferior aos restantes. À medida que se dá a lise celular, há aumento de contaminantes, como RNA, gDNA e outros materiais intracelulares devido ao total rompimento celular.

A possível causa da saída dos plasmídeos pode dar-se à possível interacção dos lípidos catiónicos com as cargas negativas expostas dos grupos fosfatos do pDNA. Isto deve-se a uma interacção parcialmente electrostática e parcialmente hidrofóbica nas interacções entre os plasmídeos e os lípidos (Stebelska, K.; *et al.*, 2005).

- Ensaios relativos a diferentes Densidades Ópticas (DO).

Para que o processo seja aplicável em larga escala, os estudos de elevada DO têm de ser viáveis. Os ensaios anteriores foram realizados em densidades ópticas baixas, por volta de 10 células/ml. Neste ensaio a DO mais elevada foi de 30 células/ml, figura 22B.

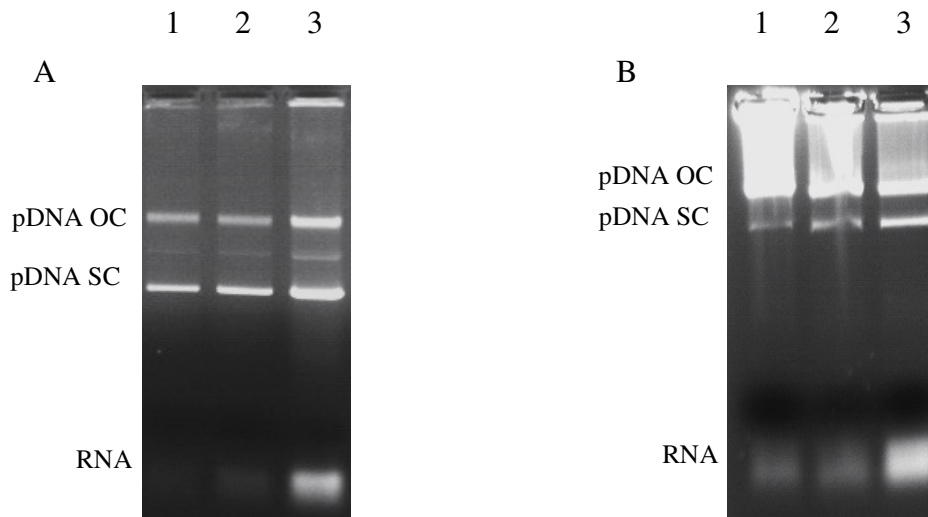


Figura 22: Legenda A: Ensaio de Lise eléctrica. Corrente constante a 5V/cm **DO: 13**; Agitação: 500 rpm, e arrefecimento em gelo. Legenda: 1- 5min., 2- 10 min., 3- 15 min. B: Ensaio de Lise eléctrica. Corrente constante a 5V/cm **DO: 30**; Agitação: 500 rpm, e arrefecimento em gelo. Legenda: 1- 5min., 2- 10 min., 3- 15 min.

Para uma elevada DO, continua-se a verificar a libertação de pDNA, mas nestes mesmos ensaios verifica-se que o processo de lise, anteriormente descrito a partir de 10 minutos, acontece mais tarde. Relativamente ao pDNA, este sai maioritariamente na isoforma cadeia aberta, ao contrário dos ensaios de DO mais baixas, figura 22 A, o que o torna menos rentável.

Pelo processo de quantificação, apresentado na tabela 8, verifica-se um aumento de DNA plasmídico libertado nos 5 minutos iniciais para DO mais elevada, tal como seria de esperar, mas não um aumento no final do processo, devido à de concentração não corresponder á massa de células do meio.

Tabela 8: Comparação de concentrações de pDNA de lises eléctricas com DO diferentes, em HPLC. Valores de concentração inferiores a 0,5 µg/ml são desprezados por serem inferiores à curva de calibração.

	Concentração de pDNA (µg/ml) DO: 30	Concentração de pDNA (µg/ml) DO:10
5 Minutos	0,5325	0
10 Minutos	0,5450	0,55129
15 Minutos	1,0556	1,11427

- Ensaios relativos a diferentes velocidades de agitação durante o processo.

Os ensaios relativos à velocidade de agitação do processo permitem verificar a influência da agitação na lise celular e na estabilização do pDNA libertado.

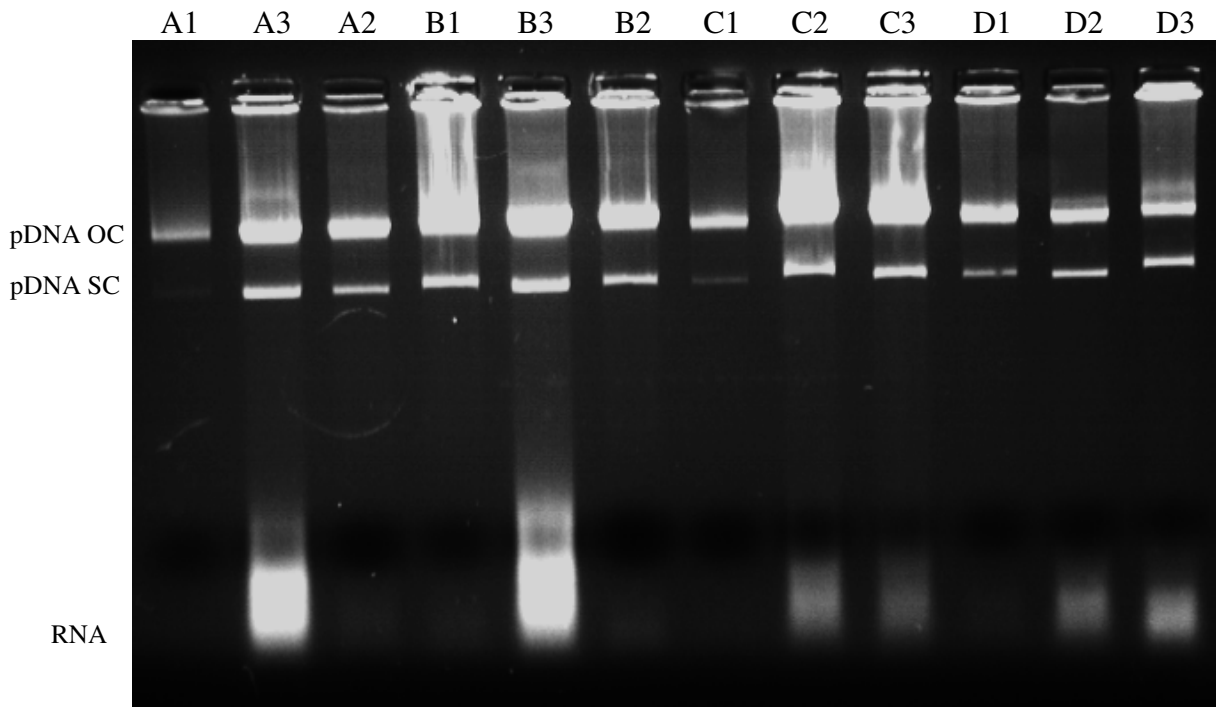


Figura 23: Ensaio de Lise eléctrica. Corrente constante a 5V/cm DO: 10 e arrefecimento em gelo. Legenda: Ensaios com amostras 1, 2 E 3 retiradas aos 4, 8 e 10 minutos, respectivamente. Amostras A – Agitação a 50 rpm; Amostras B – Agitação a 200 rpm; Amostras C – Agitação a 650 rpm; Amostras D – Agitação a 950 rpm;

A figura 23 demonstra os resultados da agitação e a sua influência na lise, recuperação e estabilidade do plasmídeo.

Uma velocidade de agitação mais elevada permite um rompimento celular mais rápido, permitindo a lise mais cedo que para valores de agitação mais baixas.

Numa agitação mais lenta a proporção de DNA plasmídico nas isoformas superenrolada e de cadeia aberta é mais equilibrada, enquanto em agitações de velocidades mais elevadas há um teor superior da isoforma de cadeia aberta.

Há, então, uma necessidade de um acerto de velocidade de agitação num ponto intermédio para que a lise celular não seja demasiado precoce nem que o teor de pDNA superenrolado, em proporção ao de cadeia aberta, seja inferior.

- Estudos realizados com *E. coli* não transformada com pDNA.

Estes ensaios têm como fundamento verificar que tipos de contaminantes intracelulares se obtêm da célula, sem a existência da transformação da bactéria com plasmídeo estudado até agora.

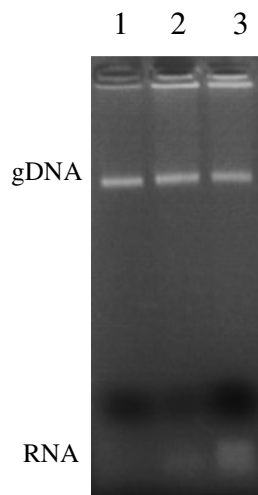


Figura 24: Ensaio de Lise eléctrica. Corrente constante a 5V/cm DO: 10; Agitação: 500 rpm e arrefecimento em gelo. Legenda: 1- 5min., 2- 10 min., 3- 15 min

Observa-se a existência de DNA genómico em baixo teor, antes da lise da célula, nos primeiros minutos de ensaio, como é visível na electroforese representada na figura 24, tal como baixo teor de RNA já nos últimos minutos de ensaio.

- Estudo do efeito das cargas submetidas no processo directamente ao pDNA, previamente purificado por kit da Qiagen Maxi.

A existência de uma proporção idêntica das duas isoformas de DNA plasmídico, superenrolado e cadeia aberta, levou à necessidade de descobrir o efeito negativo existente durante o processo para que tal acontecesse, pois o interesse final será um valor maioritário de DNA plasmídico na isoforma superenrolada.

Um das possibilidades seria o efeito das cargas ao qual o DNA plasmídico se encontra exposto após a sua libertação.

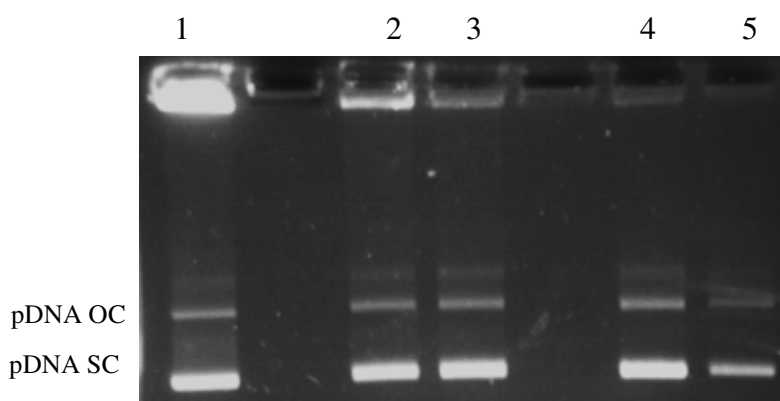


Figura 25: Ensaio de Lise eléctrica. Corrente constante a 5V/cm DO: 10; Agitação: 650 rpm e arrefecimento em gelo. Legenda: 1- Amostra padrão., 2- 5 min., 3- 10 min; 4- 15 min., 5- 20 min.

Os resultados obtidos, representados na electroforese da figura 25, permitem concluir que não existe uma influência significativa da voltagem sobre o DNA plasmídico.

Comprova-se que a voltagem aplicada não influencia a isoforma superenrolada do DNA plasmídico. Assim sendo, o baixo teor de pDNA superenrolado e o teor mais elevado de pDNA de cadeia aberta, comparativamente à lise alcalina, não é provocada pelas cargas aplicadas no processo, mas sim por um outro fenómeno.

- Estudo do efeito da temperatura da solução durante o processo anterior.

A temperatura é um dos factores que mais pode influenciar a estabilidade do pDNA na isoforma superenrolada. Por esse motivo, a necessidade do estudo da temperatura que atinge o processo global de lise eléctrica torna-se importante.

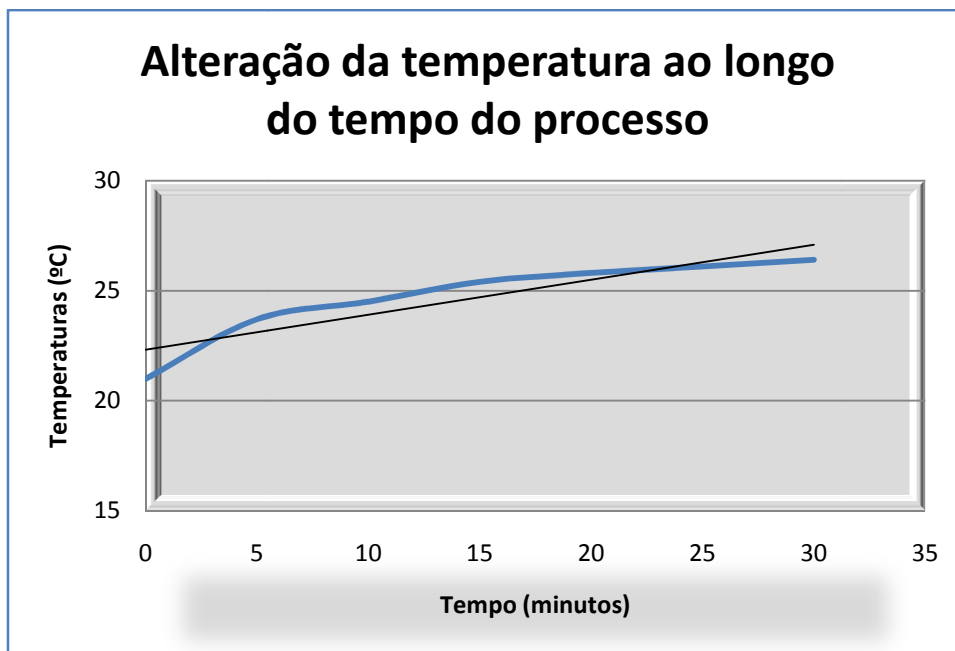


Figura 26: Gráfico referente à alteração da temperatura ao longo do tempo do processo de lise eléctrica.

A temperatura pode ser um processo de desnaturação de pDNA superenrolado, transformando-o no pDNA cadeia aberta (Sousa, *et al.*, 2007). Este mesmo ensaio permite observar a temperatura máxima que o processo pode atingir, e por sua vez poder verificar e justificar a existência de pDNA superenrolado em menor teor que numa lise alcalina. O gráfico representado na figura 26 demonstra o evoluir da temperatura ao longo do ensaio. Sabendo-se a temperatura que atinge o ensaio, permite então estudar o efeito desta mesma temperatura no plasmídeo ao longo do tempo do ensaio.

- Estudo do efeito da temperatura no DNA plasmídico ao longo do tempo. Processo efectuado em bloco de temperatura.

Após o ensaio anterior, o passo agora apresentado visa estudar o efeito da temperatura máxima que o ensaio atinge sobre o DNA plasmídico. Para isso purificou-se o DNA plasmídico por kit *Qiagen Maxi*, e colocou-se num bloco de temperatura a 30°C em diferentes tempos.

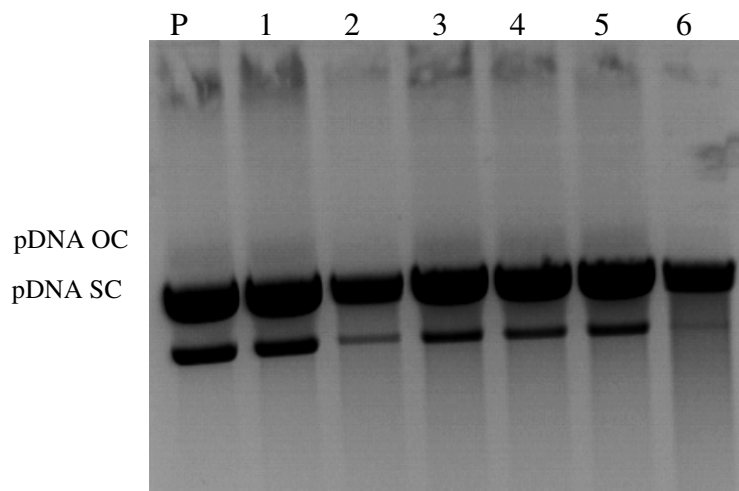


Figura 27: Ensaio de temperatura de pDNA em bloco a 30 °C. Purificação por kit Qiagen Maxi. Legenda: P – Padrão, 1- 5min., 2- 10 min., 3- 15 min., 4- 20 min., 5- 25 min., 6- 30 min.

O resultado apresentado na electroforese da figura 27, demonstra o efeito negativo da temperatura durante o processo global, afectando o plasmídeo. Ao longo do tempo, verifica-se uma diminuição do teor de pDNA na isoforma superenrolada e um aumento na isoforma de cadeia aberta.

O aumento de temperatura promove uma diminuição da quantidade de plasmídeo superenrolado, tal como descrito por Sousa, *et al.*, 2007.

Sendo esta a isoforma necessária em elevada quantidade, descrito pelas agências reguladoras, há necessidade de se controlar a temperatura e promover um aumento do teor de pDNA superenrolado.

5.2.5- Lise alcalina com tampão arginina.

Este processo foi baseado como descrito anteriormente, no processo de lise alcalina em que há uma alteração no tampão P2, substituindo NaOH por l-arginina.

Este mesmo processo foi realizado ao mesmo tempo que um processo de lise alcalina, partindo do mesmo meio de células, de forma a ser possível a sua comparação entre ambos os métodos.

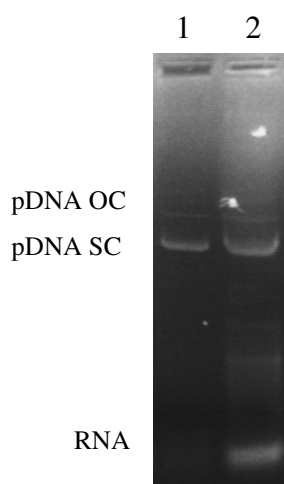


Figura 28: Ensaio do processo de lise alcalina com tampão arginina. Legenda: 1- Lise alcalina., 2- Lise alcalina com tampão arginina.

À primeira vista este processo demonstra teores mais elevados de pDNA superenrolado em relação à lise alcalina, tomada como padrão, tal como demonstra a electroforese da figura 28.

Pela quantificação efectuada comprova-se o contrário. O valor de pDNA proveniente da lise alcalina é muito superior, tal como demonstrado na tabela 9.

Tabela 9: Concentrações de pDNA na lise alcalina e na lise alcalina com tampão arginina.

Processo	Concentração de pDNA ($\mu\text{g/ml}$)
Lise alcalina	568067
Lise alcalina com tampão arginina	57846,5

Desenvolvimento de processos de recuperação de plasmídeos

CICS - Centro de Investigação em Ciências da Saúde

Tal acontecimento pode dever-se ao facto de o DNA plasmídico se encontrar ainda ligado à arginina nas amostras.

A arginina promove uma interacção de afinidade com o DNA plasmídico o que leva a uma estabilização dos mesmo durante o processo, evitando a desnaturação da isoforma superenrolada com o alto pH do processo. Neste caso, a purificação por cromatografia que se segue a um processo de lise pode eliminar essa contaminação da arginina.

6- Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

Como conclusão global deste trabalho, verifica-se que, nos processos existentes e descritos na bibliografia científica para processos de lise celular, há métodos pouco vantajosos para a obtenção de DNA plasmídico.

Relativamente aos processos de choque osmótico e choque térmico, ambos os processos não são rentáveis.

O choque osmótico permite apenas o rompimento da parede celular, e por sua vez apenas a obtenção do conteúdo periplasmático, onde os valores de DNA plasmídico são extremamente baixos. Este é um processo pouco rentável para o objectivo deste trabalho, e por essa forma também só se encontra descrito para a obtenção de enzimas e pequenas proteínas.

O choque térmico é um processo económico e útil em micro escala, mas não para a obtenção de DNA plasmídico. Mais uma vez é um processo descrito para obtenção de enzimas e proteínas, que possuem alguma resistência às grandes variações de temperatura. No caso dos plasmídeos, estes sofrem desnaturação, o que torna o processo impeditivo para a sua obtenção, até quando se trata de pequeno número de ciclos.

No processo estudado de lise eléctrica, este torna-se, ao longo deste trabalho, o mais apetecível a nível de estudos e de futuras aplicações. Trata-se de um processo que ainda se encontra num nível preliminar, pois necessita de estudos aprofundados. Este foi um processo desenvolvido de raiz e demonstra uma boa capacidade de obtenção de DNA plasmídico, embora ainda num baixo teor. É um processo económico e rápido, tornando-o muito interessante. Para este processo se tornar ideal, necessita de controlo e desenvolvimento de processos que evitem o aparecimento das isoformas de pDNA em proporções idênticas. Ou seja, o que se pretende é um valor elevado de pDNA superenrolado e baixo de pDNA de cadeia aberta. No entanto os passos iniciais estão dados, restando apenas otimizar melhor o processo.

Para que isso seja possível, é necessário que se descubra o factor que influencia o menor teor da isoforma superenrolada. É necessária a optimização de processos com controlo de temperatura, já iniciados mas que ainda não se encontram optimizados. O volume do copo onde se promove a lise é maior que o dos ensaios descritos

anteriormente, o que leva á necessidade de optimização da voltagem, tal como a própria agitação.

Futuramente poderá vir a ser possível a obtenção dos valores de DNA plasmídico superenrolado pretendidos, necessitando, então alguma optimização para se tornar num óptimo processo de obtenção de pDNA.

No processo de lise alcalina, mas com a modificação de um dos compostos do tampão de lise, substituindo o NaOH por L-arginina, conclui-se que o processo não é muito vantajoso, contrariando o que se encontra publicado na bibliografia científica por Cloninger, *et al*, 2008. É um processo idêntico à lise alcalina, regendo-se por completo neste método, mas que a utilização da arginina em vez de NaOH, permite uma estabilização de DNA plasmídico. Por esse facto, seria previsível que o valor de DNA plasmídico superenrolado fosse superior por haver maior estabilidade, mas que não se comprovou laboratorialmente.

7 – Bibliografia

Abdelnoor, A. M.; *Plasmid DNA vaccines*; Journal Current Drug, 1 (2001) 79-92.

Birnboim, H. C.; Doly, J.; *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*; Nucleic Acids Research, 7 (1979) 6.

Branski, L. K.; Pereira, C. T., Herndon, D. N.; *Gene therapy in wound healing: present status and future directions*; Gene Therapy, 14 (2007) 1-10.

Carnes, A. E.; Williamns, J. A.; *Media and process for plasmid fermentation*; Provisional Patent Applications; 2005.

Ciccolini, L.A.S., Shamlou, P.A., Titchener-Hooker, N.J.; *Time course of SDS-alkaline lysis of recombinant bacterial cells for plasmid release*; Biotechnology and Bioengineering, 60 (1998) 768-770.

Choi, J. H.; Lee, S. Y.; *Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*; Applied Microbiology and Biotechnology, 64 (2004) 625-635.

Cloninger, C.; Felton, M.; Paul, B.; Hirakawa, Y.; Metzberg, S.; *Control of pH during plasmid preparation by alkaline lysis of Escherichia coli*; Analytical Biochemistry 378 (2008) 224-225.

Debyser, Z.; *A short course on virology/vectorology/gene therapy*; Current Gene Therapy, 3 (2003) 495-499.

Diogo, M. M.; Queiroz, J. A.; Prazeres, D. M.; *Purification of plasmid DNA vectors produced in E.coli for Gene therapy and DNA vaccination applications*; Microbial Processes and Products, 18 (2003) 165-178.

Diogo, M. M.; Queiroz, J. A.; Prazeres, D. M.; *Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography*; *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (1999) 576-583.

Diogo, M. M.; Queiroz, J. A.; Prazeres, D. M.; *Scale-up of hydrophobic interaction chromatography for the purification of a DNA vaccine against rabies*; *Biotechnology Letters*, 22 (2000) 1397-1400.

Diogo, M. M.; Queiroz, J. A.; Prazeres, D. M.; *Production, purification and analyses of an experimental DNA vaccine against rabies*; *Journal of Genetic Medicine*, 3 (2001) 577-584.

Evans, R. K.; Xu, Z.; *Evaluation of Degradation pathways for plasmid DNA in Pharmaceutical formulations via accelerated stability studies*; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89 (2000) 76-87.

Eon-Duval, A.; Gumbs, K.; Ellet, C.; *Precipitation of RNA Impurities with High Salt in a Plasmid DNA Purification Process: Use of Experimental Design to Determine Reaction Conditions*; *Biotechnology and Bioengineering*, 83 (2003) 544-553.

Ferreira, G. N. M., Cabral, J. M. S.; Prazeres, D. M. F.; *Purification of supercoiled plasmid DNA using chromatography process*; *Journal Molecular Recognition*, 11 (1998) 250-251.

Ferreira, G. N. M., Cabral, J. M. S.; Prazeres, D. M. F.; *Anion Exchange purification of plasmid DNA using expanded bed absorption*; *Bioseparation*, 9 (2000) 1-6.

Ferreira, G. N. M., Monteiro, G. A.; Prazeres, D. M. F.; *Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications*; *Trends Biotechnology* 18 (2000) 380-388.

Fynan, E. F.; Webster, R.G.; Fuller, D. H.; Haynes, J. R.; Santoro, J. C.; Robinson, J. L.; *DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations*; PNAS (The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (US)), 90 (1993) 11478-11482.

García, D.; Gómez, N.; Mañas, P.; Raso, J.; Pagán, R.; *Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated*; International Journal of Food Microbiology 113 (2007) 219-227.

Hoare, M.; Levy, M. S.; *Bioprocess engineering issues that would be faced in producing a DNA vaccine at up to 100 m³ fermentation scale for influenza pandemic*; Biotechnology Progress, 21 (2005) 1577-1592.

Holmes, David S.; Quigley, Michael; *A rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids*; Analytical Biochemistry, 114 (1981) 193-197.

Inoshita, E.; Amano, A.; Tamagawa, H.; *Isolation and some properties of exohemagglutinin from the culture medium of bacteroides gingivales 381*; Infection and Immunity, 52 (1986) 421-427.

Jazzi, F. Rastgar; Karkhane, A.A.; Yakhchali, B.; Fatemi, S. S.; Deezagi, A.; *A simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor from periplasmic space of Escherichia coli*; Journal of Chromatography B, 856 (2007) 214-221.

Kennedy, J. F.; Cabral, J. M. S.; *Recovery process for biological materials*; John Wiley & Sons, 1993.

Kusumanto, Y. H.; Mulder, N. H.; Dam, W. A.; *Improvement of in Vivo Transfer of Plasmid DNA in Muscle: Comparison of Electroporation versus Ultrasound*; Drug Delivery, 14 (2007) 273-277.

MacRae, E. J.; Giannoudis, A.; Ryan, R.; Brown, N. J.; Hamdy, F. C.; Maitland, N.; Lewis, C. E.; *Gene therapy for Prostate Cancer: Current strategies and new cell-based Approaches*; *The Prostate* 66 (2006) 470-494.

Mergulhão, F. J. M.; Summers, D. K.; Monteiro, G. A.; *Recombinant protein secretion in Escherichia coli*; *Biotechnology Advances*, 23 (2005) 177-202.

Neu, H. C.; Heppel, L. A.; *The release of enzymes from Escherichia coli by Osmotic Shock and during the formation of Spheroplasts*; *Journal of Biological Chemistry*, 240 (1965) N. 9.

O'Mahony, K., Freitag, R., Hilbrig, F., Müller, P., Schumacher, I.; *Proposal for a better integration of bacterial lysis into the production of plasmid DNA at large scale*. *Journal of Biotechnology*, 119 (2005) 118–132.

Obst, M.; Luftmann; *Isolation of cyanophycin-degrading bacterium, cloning and characterization of an extracellular cyanophycinase gene (cphE) from pseudomonas anguilliseptica strain BI*; *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 25096-25105.

Panja, S.; Saha, S.; Jana, B.; Basu, T.; *Role of membrane potential on artificial transformation of E. coli with plasmid DNA*; *Journal of Biotechnology*, 127 (2006) 14-20.

Passarinha, L.A.; Diogo, M. M.; Queiroz, J. A.; *Production of ColE1 type plasmid by E.coli DH5a cultured under nonselective conditions*; *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (2006) 20-24.

Penque, D.; *Terapia génica: um objectivo ou uma realidade?* *Boletim de Biotecnologia Molecular; Avanços e aplicações; Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia*; (2000).

Prazeres, D. M. F.; Ferreira; G. N. M.; Cabral; J. M. S.; *Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks*; Trends in Biotechnology, 17 (1999) 169-174.

Prazeres, D. M. F.; Ferreira, G. N. M.; *Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination*; Chemical Engineering Processes, 43 (2004) 615-630.

Prazeres, D. M. F., Diogo, M.M., Queiroz, J. A. *Purification of Plasmid DNA by Hydrophobic Interaction Chromatography*, United States Patent 7,169,917, 2007.

Robbins, P.D., Ghivizzani, S.C.; *Viral vectors for gene therapy*. Pharmacology & Therapeutics., 80 (1998), 35 – 47.

Robbins, P.D., Tahara, H., Ghivizzani, S.C.. *Viral vectors for gene therapy*. Trends in Biotechnology, 16 (1998) 35-40.

Rybenkov, V. V.; Vologodsii, A. V.; *The effect of ionic conditions on the conformations of supercoiled DNA II. Equilibrium catenation*; Journal of Molecular Biology, 267 (1997) 312-323.

Schlick, T. ; Li, B. ; Olson, W. K.; *The influence of salt on the structure and energetics of supercoiled DNA*; Biophysics Journal, 67 (2004) 2146-2166.

Simmonds, R. S.; Shearer, M. H.; Kennedy, R. C.; Paratissol; *DNA vaccines - From principle to practice*; Today, 12 (1997) 328.

Sousa, F.; Freitas, S.; Prazeres, D.; Queiroz, J.; *Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step*; Biotechnology and Applied Biochemistry., 45 (2006) 131-140.

Sousa, F.; Matos, T.; Prazeres, D. M. F.; Queiroz, J. A.; *Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography*; Analytical Biochemistry, 374 (2008) 432-434.

Spugnini, E.; Arancia, G.; Porrello, A.; Colone, M.; Formisano, G.; Stringaro, A.; Citro, G.; Molinari, A.; *Ultrastructural Modifications of Cell Membranes Induced by Electroporation on Melanoma Xenografts*; Microscopy Research and Technique, 70 (2007) 1041-1050.

Steberlska, K.; Dubielecka, P. M.; Sikorski, A. F.; *The effect of PS content on the ability of natural membranes to fuse with positively charged liposomes and lipoplexes*, Journal of Membrane Biology, 206 (2005) 203-214.

Tigh, H.; Corr, M.; Roman, M.; Raz, E.; *Plasmid DNA vaccines*; Immunology Today, 19 (1998) 89-97.

Thomas, J. D.; Daniel, R. A.; Errington J.; Robinson C.; *Export of active green fluorescent protein to the periplasma by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in Escherichia coli*; Molecular Microbiology, 39 (2001) 47-53.

Urthaler, J.; Necina, T.; *Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy*; Acta Biochimica Polonica, 52 (2005) 703-711.

Wanarska, M; Hildebrandt, P.; Kur, J.; *A freeze-thaw method for disintegration of Escherichia coli cells producing T7 lysozyme used in pBAD expression systems*; Acta Biochimica Polonica, 54 (2007) 761-772.

Wang, Hsiang-Yu; Bhunia, Arun K.; Lu, Chang; *A microfluidic flow-through for high throughput electrical lysis of bacterial cells based on continuous dc voltage*; Biosensors and Bioelectronics, 22 (2006) 582-588.

XU, Z.; Wen-he, S.; Hao, C.; *Effects of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy*; Journal of Zhejiang University Science, 6 (2005) 396–400.

Zabriskie, D. W.; Arcury, E. J.; *Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms*; Enzyme Microbiology and Technology, 8 (1986) 706-717.

Zilli, A.; *Terapia Génica*; Boletim de biotecnologia, 13 (2000) 8-10.

Outras Referências:

Amersham Hand Book; 2-D Electrophoresis; using immobilized pH gradients; Principles and Methods; 80-6429-60; 2005.

Jarozeski, M. J.; Heller, R.; Gilbert, R.; *Electrochemotherapy, Electrogenetherapy, and transdermal drug delivery. Electrically Mediated Delivery of Molecules to cells; Methods in Molecular MedicineTM*; Humana Press, 2000.