



# ***Desenvolvimento de Processos de Recuperação de Plasmídeos***

*CICS – Centro de Investigação em Ciências da Saúde  
Universidade da Beira Interior*

**Tiago Manuel Batista Matos, m1817  
12-06-2008**



Universidade da Beira Interior  
Departamento de Química  
Covilhã, 2008

## ***“Desenvolvimento de Processos de Recuperação de Plasmídeos”***

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para a obtenção de grau de Mestre em Bioquímica, realizado no Centro de Investigação em Ciências da Saúde.

***Mestrando:*** Tiago Manuel Batista Matos, aluno n.º m1817

***Orientador:*** Professor Dr. João Queiroz

***Local de investigação:*** CICS – Centro de Investigação em Ciências da Saúde,  
Universidade da Beira interior

X

---

Tiago Matos  
Aluno de Mestrado 2007/2008

## *Agradecimentos*

Mais um ano se conclui neste meu trajecto rumo à realização pessoal. Só me posso sentir feliz pelo facto de ter conseguido mais uma vez cumprir mais um passo num dos muitos sonhos que possuo.

Tenho de agradecer ao Professor João Queiroz o facto de me ter deixado mais uma vez poder trabalhar e aprender com ele e, acima de tudo, me ter deixado reproduzir e evoluir com as minhas convicções. Espero poder continuar este trabalho e se possível vir a compensá-lo por tudo.

Ao Professor António Mendonça pela simpatia e disponibilidade em ceder o material usado em parte do trabalho.

A Fani e Luís pela amizade, companheirismo e acompanhamento laboratorial.

A todos os Professores da Universidade da Beira Interior que me permitiram aprender e desenvolver durante o curso e durante o mestrado e a todos os colegas do CICS.

A minha Mãe, ao Rolando, pelo apoio e por me terem criado em redor uma família que todos sonham em criança. Ao meu pai, que apesar da distancia está sempre comigo.

Aos meus Avós Maternos e a minha Avó Paterna, que além de Avós foram e serão meus pais que tanto os amo. Ao meu falecido Avô Paterno que tanto sinto falta.

Aos meus Padrinhos e primas que os adoro e que sempre estiveram quando foram precisos.

Aos meus amigos mais próximos: Antão, Filo e Rui, Emanuel, Toni, Marinel, Marco, Joana, Max, Bruno, Ângela, Roberto, Roxo, Hugo, entre outros; que são os melhores amigos do mundo.

À minha namorada Sara pela compreensão, amizade, carinho e atenção em todos os momentos que necessitei. Esta tese foi desenvolvida com o teu apoio.

A todos, o meu obrigado e votos de sincera felicidade.

# *Índice Geral*

	Páginas
Abstract	1
1-Introdução Teórica	2
1.1 – Terapia génica	2
1.1.2 – Conceito e Princípio de Terapia Génica	5
1.1.3 – Vectores	8
1.1.3.1 – Vectores celulares	8
1.1.3.2 – Vectores Virais	9
1.1.3.3 – Vectores não Virais	13
1.1.4 – DNA plasmídico (pDNA)	16
1.1.5 – Controlo de Qualidade	21
1.1.6 – O Futuro da Terapia Génica	23
1.2 – Recuperação de Plasmídeos	24
1.2.1 – Lise Alcalina	31
1.2.2 – Choque Osmótico	33
1.2.3 – Lise Eléctrica	34
1.2.4 – Lise Térmica	38
2 – Hipótese e Objectivos	39
3 – Materiais e Métodos	40

3.1 – Reagentes	40
3.1.1 – Plasmídeo pVAX1-LacZ	40
3.2 – Meio de Crescimento	41
3.3 – Marcadores de Peso Molecular	43
3.4 – Outros Reagentes	43
3.5 – Equipamentos Diversos	44
4 – Protocolo Experimental	45
4.1 – Esterilização de meios e equipamentos	45
4.2 – Fermentação	45
4.3 – Recuperação Celular	47
4.4 – Lise Celular, Clarificação e Concentração	48
4.4.1 – Lise Alcalina	48
4.4.2 – Lise Osmótica	49
4.4.3 – Lise Térmica	50
4.4.4 – Lise Eléctrica	51
4.4.5 – Lise Alcalina com tampão arginina	52
4.5 – Electroforese	53
4.6 – Determinação da Concentração de DNA plasmídico na solução de lise por HPLC.	54
5 – Resultados e Discussão	56

5.1 – Fermentação	56
5.2 – Lise Celular	60
5.2.1 – Lise Alcalina	61
5.2.2 – Lise por Choque Osmótico	63
5.2.3 – Lise por Choque Térmico	64
5.2.4 – Lise Eléctrica	66
5.2.5- Lise alcalina com tampão arginina.	75
6 – Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras	77
7 – Bibliografia	79

## Índice de Figuras

Figura	Legenda	Adaptação	Página
1	Processo esquemático global da aplicação da terapia genica no caso do vírus HIV	VirxSys.net	3
2	Processo esquemático da terapia genica	Chinese-culture.net	7
3	Utilização de “arma génica” para incorporação de DNA em células de Langerhan’s da pele	www.ifpma.org/Influenza	14
4	Esquema de uma bactéria com plasmídeos no seu interior	<a href="http://dragon.seowon.ac.kr">http://dragon.seowon.ac.kr</a>	16
5	Modelo esquemático da isoforma superenrolada	Prazeres <i>et al.</i> , 1998	18
6	Modelo esquemático de um plasmídeo geneticamente modificado	<i>Invitrogen</i>	19
7	Esquema global do processo de produção e purificação de pDNA	Prazeres <i>et al.</i> , United States Patent, 2007	24
8	Composição das paredes celulares das <i>Gram-positivas</i> e <i>Gram-negativas</i>	www.sigmaaldrich.com	27
9	Modelo esquemático dos tipos de rompimento celular	<i>Recovery Processes for Biological Materials</i> , 1993	28
10	Estado químico específico de transição por rearranjo de moléculas lipídicas constituintes da membrana.	James C. Weaver, <i>Electroporation: A General Phenomenon for Manipulating Cells and Tissues</i> , 1992.	35
11	Modelo estrutural do plasmídeo <i>pVAX1-LacZ</i>	Invitrogen life technologies	40

12	Fotografia ao microscópio óptico composto (1000x) de uma suspensão celular resultante de uma fermentação à temperatura de 30°C. Coloração de Gram da <i>E.coli</i> DH5α.	Fotografia cedida por Filomena Silva, CICS	45
13	Exemplo de uma preparação de uma electroforese	Amersham Handbook	53
14	Curva de calibração da área do pico em função da concentração de plasmídico pVAX1-LacZ.	-	55
15	Curva de crescimento típica para uma população bacteriana numa cultura descontínua	www.chemeng.mcmaster.ca	58
16	Curva de crescimento da <i>E. coli</i> DH5α transformada com o plasmídeo pVAX1-LacZ em balão com meio de crescimento TB	-	59
17	Electroforese relativa a uma lise alcalina	-	62
18	Cromatograma relativo ao processo de quantificação de pDNA em HPLC	-	62
19	Electroforese relativa a uma lise osmótica.	-	63
20	Lise Térmica por comparação de número de Ciclos de 42°C- Azoto líquido	-	64
21	Ensaio de Lise eléctrica, com corrente constante a <b>5 e 10V/cm;</b>	-	66
22	Ensaio de Lise eléctrica. Corrente constante a 5V/cm <b>DO: 13;</b>	-	68
23	Ensaio de Lise eléctrica a diferentes velocidades de agitação;	-	70

24	Ensaio de Lise eléctrica sem pDNA	-	71
25	Ensaio de corrente eléctrica sobre o pDNA	-	72
26	Gráfico referente à alteração da temperatura ao longo do tempo do processo de lise eléctrica.	-	73
27	Ensaio de temperatura de pDNA em bloco a 30 °C.	-	74
28	Ensaio do processo de lise alcalina com tampão arginina	-	75

## *Índice de Tabelas*

Tabela	Legenda	Adaptação	Página
Tabela 1	Critério e métodos analíticos para plasmídeos pelas normas da EMEA	Adaptado de Prazeres e Ferreira, 2004	22
Tabela 2	Composição do meio TB e respectivas concentrações	-	41
Tabela 3	Reagentes usados ao longo do trabalho e suas características	-	42
Tabela 4	Reagentes utilizados para controlo de pH, controlo de espuma e para calibração do eléctrodo de pH.	-	43
Tabela 5	Resultados de DO ao longo das horas na pré-fermentação	-	57
Tabela 6	Resultados de DO ao longo das horas na fermentação	-	58
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.	-	65
Tabela 8	Comparação de concentrações de pDNA de lises eléctricas com DO diferentes, em HPLC	-	69