



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Desenvolvimento de criogéis funcionalizados com barbituratos para a purificação de uma vacina de DNA plasmídico contra o Influenza

Andreia Segura Pinheiro Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º Ciclo de Estudos)

Orientador: Prof. Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida

Co-Orientadora: Prof^ª. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

Covilhã, outubro de 2016

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”*

Marie Curie

Para as pessoas mais importantes da minha vida:

Maria José, Augusto, Duarte e Luís.

Agradecimentos

Quero agradecer, em primeiro lugar, ao meu orientador, Professor Paulo Almeida, pelo apoio e amizade, pela partilha de conhecimentos e, principalmente, por me ensinar a gostar de Química Orgânica.

À minha co-orientadora, professora Cândida Tomaz, quero agradecer pela orientação, por todo o conhecimento transmitido e pela motivação perante resultados menos conseguidos.

Não poderia deixar de agradecer à Universidade da Beira Interior, ao Departamento de Química e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde, em especial ao grupo de Biotecnologia e Ciências Biomoleculares, em particular à Mestre Joana, e ao grupo de colegas do laboratório de Síntese Orgânica, em particular ao João, à mestre Andreia e à Doutora Catarina, responsáveis por um bom ambiente e apoio constantes sem os quais teria sido muito mais difícil ultrapassar os obstáculos que foram surgindo.

Aos meus colegas e amigos Vânia, Diogo Cláudia e Zélia deixo o mais sincero agradecimento por cinco anos de companheirismo e amizade, por tornarem a minha jornada inesquecível e por serem uma das melhores coisas que a cidade-neve trouxe à minha vida.

Um especial obrigado à Inês, ao Filipe, ao Tiago, ao Vítor e, em particular, à Johanna pela amizade e apoio incondicionais ao longo deste percurso e por estarem sempre lá: vocês são a minha segunda família.

À minha madrinha, Nélia, e padrinho, David, que estiveram sempre presentes.

Tendo consciência que sozinha nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento especial aos meus pais, Maria José e Augusto, e ao meu irmão, Duarte, por serem modelos de coragem e pelo seu apoio incondicional, incentivo, amizade e ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. Por sempre me incentivarem perante os desafios, a fazer mais e melhor, quero partilhar convosco a alegria de os conseguir vencer continuamente.

Finalmente gostaria de te agradecer a ti, Luís, por todo o amor, carinho, cumplicidade e paciência em todas as circunstâncias, e pelo apoio ao longo destes anos. Obrigada por permaneceres junto a mim em todos os momentos e pelo teu encorajamento no sentido de acreditar que é possível ultrapassar todos os desafios. E por todas as horas de correções minuciosas, mais uma vez, muito obrigada companheiro.

Obrigada a todos.

Resumo

O vírus influenza é a causa de uma doença respiratória grave, comumente chamada de gripe, de elevada transmissibilidade e distribuição global e que provoca elevados níveis de mortalidade por todo o mundo. A melhor opção para travar esta doença viral e contagiosa é a vacinação. Apesar das vacinas da gripe convencionais, baseadas na tecnologia de ovos de galinha embrionados, serem normalmente eficazes, apenas conferem proteção contra as estirpes dominantes de cada ano e têm um risco zoonótico associado. Deste modo, são produzidas anualmente novas vacinas para antecipar as estirpes circulantes do vírus, processo que leva meses até estar concluído. As vacinas de DNA, baseadas na tecnologia do DNA recombinante, são uma alternativa promissora relativamente à vacinação convencional uma vez que são efetivas, e têm um processo de produção genérico e fácil de transpor para larga escala, em oposição ao complexo processo de produção associado às vacinas convencionais. Esta terapêutica consiste na expressão de um plasmídeo com os genes que codificam os antígenos de interesse num hospedeiro apropriado, permitindo a sua produção *in vivo*. No entanto, as vacinas de DNA requerem uma grande quantidade e com elevado grau de pureza, da isoforma superenrolada do DNA plasmídico biologicamente ativa. A cromatografia tem sido a técnica de escolha na purificação do pDNA por ser reprodutível, fiável e fácil de transpor para larga escala. No entanto, as matrizes convencionais usadas para este fim apresentam algumas limitações como as suas baixas propriedades de transferência de massa e baixa capacidade de ligação para moléculas maiores com o pDNA. Neste sentido, os criogéis podem ser utilizados no processo *downstream* por serem uma boa alternativa às matrizes cromatográficas convencionais, devido aos seus poros grandes e interconectados, boa difusibilidade e capacidade de ligação entre a molécula alvo e o suporte. O ácido barbitúrico, bem como os seus análogos tio- e/ou *N,N*-di-substituídos podem ser facilmente ligados aos criogéis ativados com grupos epóxido fazendo uso da bem descrita reatividade nucleofílica do C-5 na forma de enol ou enolato.

Deste modo, foram preparados suportes cromatográficos baseados em criogéis derivatizados em condições ácidas e utilizando ligandos barbitúricos representativos como o ácido barbitúrico, tiobarbitúrico e 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico, com diferentes concentrações de ligando. Assim, no presente trabalho de investigação, foi testada a purificação do pDNA NTC 7482-41H-VA2 HA com 6.471 kbp que codifica a glicoproteína antigénica de superfície do vírus influenza, hemaglutinina, utilizando suportes de criogéis derivatizados com barbituratos.

Para isto, foram quimicamente sintetizadas colunas de criogel com diferentes densidades de ligando. Inicialmente, foi estudado o perfil de retenção e eluição bem como a separação da isoforma superenrolada do pDNA da isoforma circular aberta, com base nas diferentes matrizes sintetizadas, sendo a coluna de criogel com ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico com 5,0 mg/mL, aquela que demonstrou os melhores resultados, sendo por isso a escolhida para os estudos

posteriores de separação de isoformas. Este suporte foi explorado através da manipulação de diferentes concentrações de sal e valores de pH, nos equipamentos cromatográficos *Flash Protein Liquid Chromatographic* e *ÄKTA Purifier*, numa tentativa de separar a isoforma superenrolada do pDNA como exigido pelas agências reguladoras. A melhor estratégia de separação das isoformas consistiu na aplicação de um gradiente crescente de cloreto de sódio usando 10,0 mM de tampão acetato de sódio com pH 5,0 como passo de ligação, e uma estratégia de eluição por dois passos usando o mesmo tampão com 0,550 M, seguido de 1,0 M de cloreto de sódio, que resultou numa separação parcial das isoformas sc e oc do pDNA do amostra pré-purificada. Na amostra de lisado, a utilização de 10,0 mM de tampão acetato de sódio com pH 5,0 como passo de ligação, e uma estratégia de eluição por dois passos usando o mesmo tampão com 0,263 M, seguido de 2,500 M de cloreto de sódio promoveu a separação da isoforma superenrolada do DNA do RNA, proteínas e outras impurezas com 65,60 % de pureza e um grau de recuperação de 88,0 %. Os resultados obtidos demonstram a aplicabilidade dos criogéis de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico com 5,0 mg/mL na separação e purificação das vacinas de pDNA contra o vírus influenza por cromatografia de afinidade.

Palavras-chave

Influenza; gripe; vacinas de DNA; pDNA; purificação; cromatografia de afinidade; criogéis; barbituratos.

Abstract

The influenza virus is the cause of a severe respiratory disease, commonly called flu, with high transmissivity, global distribution and high levels of mortality all over the world. The best option to prevent this viral and contagious disease is vaccination. Despite the conventional influenza vaccines, based on embryonated chicken eggs technology, are usually effective, they only provide protection against the dominant strains each year and have a zoonotic risk associated. Thus, new vaccines must be produced annually to anticipate circulating virus strains, a process which takes months to be completed. DNA vaccines are based on recombinant DNA technology and are a promising alternative to conventional vaccines, since they are effective, and have a generic production process and easy to upscale contrary to the complex production process associated to conventional vaccines. This therapy consists of an expression plasmid with the gene encoding the antigen of interest in a suitable host, allowing their production in vivo. However, to *scale-up* this technology, pDNA vaccines require a large quantity of highly pure biologically active supercoiled (sc) plasmid DNA (pDNA) with pharmaceutical grade which is obtained by the purification steps at downstream processing level. Chromatography has been the technique of choice in pDNA purification because is reproducible, reliable and easy to transpose to large scale. However, conventional matrices used for this purpose have some limitations such as their low mass transfer properties and low binding capacity for larger molecules such as pDNA. In this regard, cryogels can be used in downstream process to be a good alternative to conventional chromatography matrices, due to its large pores and interconnected diffusivity and good binding capacity between the target molecule and the support. Barbituric acid, their thio and/or *N,N*-disubstituted analogs can be easily linked to epoxy based cryogels using the very well-known reactivity of the C-5 as enol or enolate. In the present study, chromatographic supports were prepared using cryogels derivatized with barbiturates such as barbituric acid, thiobarbituric and 1,3-diphenyl-2-thiobarbituric at different concentrations. Thus, the purification of a plasmid NTC 7482-41H-VA2 HA encoding the surface glycoprotein of influenza, hemagglutinin was performed using cryogels derivatized with barbiturates with different ligand densities as supports. Initially, the retention and elution profile was studied as well as the separation of pDNA sc isoform isoform of open circular, in different matrices. The cryogel with 1,3-diphenyl-2-thiobarbituric acid (5,0 mg / ml) has shown the best results and was therefore chosen for further studies separation of isoforms using different salt concentrations and pH values , in the *Flash Protein Liquid Chromatographic* and *ÄKTA Purifier* equipments,. The better separation strategy was applied using 10,0 mM sodium acetate buffer at pH 5,0 as binding step and the elution was achieved with two steps using the same buffer containing 0,550 M, followed by 1,0 M chloride sodium. The lysate was purified using 10,0 mM sodium acetate buffer at pH 5,0 as binding step, followed by two steps using the same buffer with 0,263 M and by 2,50 M sodium chloride respectively.

The separation of sc isoform from RNA, proteins and other impurities was performed and a 65.60 % purity and degree of recovery of 88,0 % was obtained. The results demonstrate the potential applicability of cryogels derivatized with acid 1,3-diphenyl-2-thiobarbituric in the separation and purification of of influenza pDNA vaccines by affinity chromatography.

Keywords

Influenza; Flu infection; DNA Vaccines; pDNA; Purification; Affinity Chromatography; Cryogels; barbiturates.

Índice

Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1 Vírus Influenza	1
1.1.1 Estrutura do vírus e organização do seu genoma	3
1.1.2. Vacinação contra o vírus influenza	5
1.2. Terapias baseadas em DNA	10
1.2.1. Terapia génica	11
1.2.2. Vacinas de DNA	13
1.2.3. Sistemas de entrega de genes	14
1.3. DNA plasmídico	19
1.3.1. Processo <i>upstream</i> - Construção e produção do plasmídeo.....	21
1.3.2. Processo <i>Downstream</i> - Isolamento do plasmídeo	21
1.4. Criogéis	32
1.4.1. Preparação de criogéis	34
1.4.2. Preparação da solução de precursores de criogéis	35
1.4.3. Congelamento da solução.....	36
1.4.4. Descongelamento do criogel	36
1.4.4. Poli (metacrilato de 2-hidroxietilo - metacrilato de glicidilo) [poli (HEMA-GMA)].....	37
1.5. Objetivos	39
Capítulo 2	41
Parte Experimental	41
2.1. Materiais, solventes e reagentes	41
2.2. Equipamentos	43
2.3. Métodos	45
2.3.1. Síntese do criogel poli (HEMA-GMA)	45
2.3.2. Imobilização do Ácido Barbitúrico, tiobarbitúrico e 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico ao criogel poli (HEMA-GMA) a 5, 10,0 e 40 mg/mL	45
2.3.3. Produção do pDNA pVAX1-LacZ 6,05 kpb.....	46
2.3.4. Lise, isolamento primário e purificação do plasmídico pVAX1-LacZ 6,05 kpb.....	46
2.3.5. Produção do pDNA NTC 7482-41H-VA2 HA	47
2.3.6. Lise, isolamento primário e purificação do plasmídico NTC 7482-41H-VA2 HA	47
2.3.7. Ensaio Cromatográficos	48

2.3.8. Eletroforese em Gel de Agarose	50
2.3.9. Quantificação da isoforma superenrolada do pDNA	50
2.3.10.0. Quantificação de proteínas.....	51
Capítulo 3	53
Resultados e Discussão	53
3.1. Imobilização dos Criogéis	53
3.2 Caracterização dos suportes cromatográficos	55
3.2.1. Capacidade de reidratação por “Swelling degree”	55
3.2.2. SEM e Análise elementar	55
3.3. Estudos preliminares de cromatografia de afinidade por fluxo de gravidade	64
3.4. Ensaio cromatográfico no sistema FPLC	65
3.4.1. Ensaio cromatográfico com o criogel poli (HEMA-GMA) (suporte de controlo).....	65
3.4.2 Ensaio cromatográfico com criogel ácido barbitúrico	66
3.4.3 Ensaio cromatográfico com criogel ácido tiobarbitúrico	69
3.4.4 Ensaio cromatográfico com criogel ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico	76
3.5. Ensaio cromatográfico no sistema ÄKTA Purifier	89
3.5.1 Ensaio cromatográfico com criogel ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 5,0 mg/mL.....	89
3.7. Análise da recuperação e da pureza do pDNA através da coluna analítica fenilsefarose	98
3.7.1. Análise da presença de proteínas na amostra	99
3.7.2. Análise da recuperação e da pureza do pDNA através da coluna analítica Phenil-Sepharose®	100
Capítulo 4	102
Conclusões e Perspetivas Futuras	102
Capítulo 5	105
Referências Bibliográficas	105

Lista de Figuras

Figura 1: Percentagem de espécimes respiratórios com resultado positivo para influenza e distribuição dos subtipos do vírus a nível mundial (http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/, consultado a 09/08/2016).

Figura 2: Modelo da estrutura do vírus influenza (adaptado de Klimov *et al.*, 2012).

Figura 3: Processo de produção da vacina do vírus influenza (adaptado de Tosh *et al.*, 2010,0).

Figura 4: Representação gráfica das maiores áreas de incidência da terapia baseada em DNA (adaptado de Wirth T. *et al.*, 2013).

Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de atuação das vacinas de DNA (A) e da Terapia génica (B) (adaptado de Gaspar *et al.*, 2011).

Figura 6: Esquemática de um plasmídeo (adaptado de Prazeres *et al.*, 2001).

Figura 7: Topologias de plasmídeo: A - representação esquemática; B- DNA oc, ln e ac representados em electroforese em gel de agarose (adaptado de Molloy *et al.*, 2004).

Figura 8: Representação esquemática das principais operações do processo *upstream* durante o processo de produção de sc pDNA (adaptado de Ferreira *et al.*, 2000).

Figura 9: Representação esquemática das principais operações durante o processo *downstream* de produção de sc pDNA (adaptado de Ferreira *et al.*, 2000).

Figura 10,0: Esquemática dos diversos tipos de cromatografia (adaptado de Healthcare, 2010,0).

Figura 11: (X=O,S) Ácido barbitúrico (X=O), Ácido Tiobarbitúrico (X=S).

Figura 12: Substituições C-2 e C-5 do ácido barbitúrico (adaptado de Neumann, 2004).

Figura 13: Estrutura do ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico.

Figura 14: Representação estrutural dos diferentes suportes cromatográficos (A) partículas não porosas (difusão); (B) partículas porosas (difusão); (C) partículas superporosas (perfusão); (D) Partículas com camadas porosas; (E) membranas; (F) criogéis; (G) monólitos (adaptado de Sousa *et al.*, 2012; Billen *et al.*, 2007).

Figura 15: Representação esquemática da formação de criogéis (adaptado de Ertürk e Mattiasson, 2014).

Figura 16: Polímero poli (HEMA-GMA).

Figura 17: Recta de calibração com padrões de pDNA (1,0 a 50,0 µg/mL).

Figura 18: Curva de referência com padrões de Albumina sérica bovina (10,0 µg/mL a 10,0 µg/mL).

Figura 19: Imagem SEM do criogel de controlo com ampliação 10 x e 1000 x;

Figura 20: Concentração do criogel vs concentração de ligando imobilizado determinada por análise elementar

Figura 21: Imagem SEM do criogel de Ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 6mg/mL com ampliação de 70 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita).

Figura 22: Imagem SEM do criogel de Ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 7mg/mL com ampliação de 200 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 500 x (imagem à direita).

Figura 23: Imagem SEM do criogel de Ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 8mg/mL com ampliação de 85 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita)

Figura 24: Imagem SEM do criogel de Ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 9mg/mL com ampliação de 70 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita).

Figura 25: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de controlo. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 µL.

Figura 26: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido barbitúrico 40,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 em A, pH 7 em B e pH 10,0,0 em C; a eluição com 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM aos mesmos valores de pH, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 µL.

Figura 27: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido barbitúrico 10,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 µL.

Figura 28: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetado na coluna de criogel de ácido barbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 µL.

Figura 29: Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 40,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 µL.

Figura 30: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 10,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com a 0,25 M, 0,50 M, 0,75 M, 1,0 M e 2,50 M de

tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 µL.

Figura 31: (A) Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 4,0 (A), pH 5,0,0 (B), pH 6,0 (C), pH 6,5 (D), pH 7 (E), pH 8 (F), pH 9 (G), pH 9,50 (H), pH 10,0,0 (I) e pH 12,0 (J) e a eluição com a 0,25 M, 0,50 M, 0,75 M, 1,0 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 12,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 µL (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; linha 3: fração correspondente ao pico 3; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Figura 32: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 40,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,0 µL.

Figura 33: Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 10,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 7 (Figura 45 A) e pH 5,0 (Figura 45 B) e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 7 (Figura 45A) e a 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M e 2,50 M (Figura 45 B), como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL.

Figura 34: Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 7,0 (Figura 44 A) e pH 5,0,0 (Figura 44 B) e a eluição com por passos a 0,25 M, 0,50 M, 0,75 M, 1,0 M e 2,50 M em ambos os casos, de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 7 (Figura 44 A) e pH 5,0 Figura 44 B), como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL.

Figura 35: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com por passos a 0,25 M, 0,51 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Figura 36: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,25 M, 0,52 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; linha 3: fração correspondente ao pico 3. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Figura 37: (A) Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com por passos a 0,52 M, 0,75 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; linha 3: fração correspondente ao pico 3. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Figura 38: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com por passos a 0,53 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA;

Figura 39: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com por passos a 0,54 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Figura 40: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com por passos a 0,545 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1;

linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Figura 41: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com por passos a 0,55 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA;

Figura 42: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0 e a eluição com por passos a 0,25 M, 0,5 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Figura 43: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,25 M, 0,50 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,0 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Figura 44: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,25 M, 0,5, M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Figura 45: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de NTC 7482-41H-VA2 Hainjetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com

tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,20M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Figura 46: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,05M e 2,0 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Figura 47: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 1,0 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Figura 48: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de NTC 7482-41H-VA2 HA injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,55M e 1,0 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Figura 49: (A) Perfil cromatográfico de lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,17M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 500,0 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Figura 50: (A) Perfil cromatográfico de lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,1625 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 500,0 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Figura 51: (A) Perfil cromatográfico de lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,1675 M e 2,25 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 500 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Figura 52: (A) Perfil cromatográfico de lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,2625 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 µL. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Condições estabelecidas pelas agências reguladoras relativamente à presença de contaminantes de plasmídeo resultantes da plataforma biotecnológica recombinante (adaptado de Stadler *et al.*, 2004; Llinman *et al.*, 2010,0).

Tabela 2: Métodos cromatográficos de afinidade para purificação de pDNA (adaptado de Sousa *et al.*, 2008).

Tabela 3: Tipos de matrizes cromatográficas e suas características principais (adaptado de Billen *et al.*, 2007).

Tabela 4: Tabela síntese dos criogéis sintetizados e funcionalizados.

Tabela 5: Capacidade de reidratação do criogel poli (HEMA-GMA).

Tabela 6: Análise elementar das criogéis ácido barbitúrico, tiobarbitúrico e 1,3 difenil-2-tiobaritúrico (5,0, 10,0 e 40,0 mg/mL).

Tabela 7: Tabela comparativa da concentração dos criogéis, da concentração de ligando imobilizado determinada por análise elementar e da estrutura dos criogéis do ácido barbitúrico na ampliação de 10,00x (imagem à esquerda) e na ampliação de 10,000 x (imagem à direita).

Tabela 8: Tabela comparativa da concentração dos criogéis, da concentração de ligando imobilizado determinada por análise elementar e da estrutura dos criogéis do ácido tiobarbitúrico na ampliação de 100 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita).

Tabela 9: Tabela comparativa da concentração dos criogéis, da concentração de ligando imobilizado determinada por análise elementar e da estrutura dos criogéis do ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico na ampliação de 100 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita).

Tabela 10: Concentrações de isoformas, gDNA e RNA.

Tabela 11: Análise da pureza e grau de recuperação do sc pDNA isolado do lisado de E.coli através da cromatografia de afinidade através da coluna de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico.

Tabela 12: Quantificação das proteínas no lisado injetado e nos picos de interesse;

Lista de Abreviaturas

AC	Cromatografia de afinidade (<i>Affinity chromatography</i>);
AE	Análise elementar
APS	Persulfato de amônio (<i>Ammonium persulfate</i>)
ATR	Refletância total atenuada (<i>Attenuated total reflectance</i>)
BCA	Ácido bicinconínico (<i>Bicinchoninic acid</i>)
bp	Base pair
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
c.d.o.	Comprimento de onda
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EMEA	Agência europeia para a avaliação de produtos médicos (<i>European agency for the evaluation of medical products</i>)
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
gDNA	DNA genómico
GABA	Ácido γ -aminobutírico (<i>γ-aminobutyric acid</i>)
GMA	Metacrilato de glicidilo (<i>Glycidyl methacrylate</i>)
HA	Hemaglutinina
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietilo
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
IMAC	Cromatografia de afinidade por iões imobilizados
IIV	Vacina de influenza inativada (<i>Influenza inactivated vaccine</i>)
LAIV	Vacina ativa atenuada para influenza (<i>Live attenuated influenza vaccine</i>)
kbp	Quilo pares de bases (<i>kilo-base pair</i>)
MBAAm	<i>N,N'</i> -metileno-bis(acrilamida)
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal (<i>Main Histocompatibility Complex</i>)
NA	Neuraminidase
NP	Nulceoprotein
NS	Proteína não estrutural (<i>Non-structural protein</i>)
oc	Circular aberta (<i>open circular</i>)

ORI	Origem de Replicação
pDNA	Ácido desoxirribonucleico plasmídico(<i>plasmid Desoxyribonucleic acid</i>)
Poli(HEMA-GMA)	Poli [(metacrilato de 2-hidroxietilo)-co-(metacrilato de glicidilo de metacrilato)]
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNP	Complexo ribonucleoproteico (<i>Ribonucleoprotein</i>)
sc	Superenrolada (<i>supercoiled</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Espectroscopia eletrônica de varrimento (<i>Scanning electron microscopy</i>)
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametilenodiamino
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Capítulo 1

Introdução

1.1 Vírus Influenza

Por todo o mundo, as epidemias sazonais provocadas pelo vírus influenza são a causa de dois a cinco milhões de casos de doença grave e de mais de 250.000 a 500.000 mortes por ano (Cox *et al.*, 1999). Infecções provocadas pelo vírus influenza são, por isso, alvo de constantes preocupações em termos de saúde pública devido às complicações que daí advêm. O vírus influenza é um agente infeccioso que coloniza o epitélio das vias respiratórias, sendo responsável por uma infecção aguda, comumente chamada de gripe, de elevada transmissibilidade e distribuição global (Cox *et al.*, 1999).

A doença viral provocada pelo vírus influenza caracteriza-se normalmente por um curto período de incubação (um a quatro dias) e início abrupto dos sintomas que são predominantemente sistêmicos incluindo febre, calafrios, tremores, dores de cabeça e mialgia, bem como sintomas respiratórios como tosse seca e dor de garganta (Cox *et al.*, 1999).

Existem três tipos de vírus influenza: A, B e C, com diferenças genéticas e antigénicas nas suas glicoproteínas de superfície. O vírus influenza C causa apenas infecções respiratórias leves, pelo que não possui relevância clínica em humanos nem impacto na saúde pública e não está relacionado com epidemias. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), os vírus influenza A e B são responsáveis por epidemias sazonais, sendo o vírus influenza A responsável pelas grandes pandemias, pelo facto de apresentar maior variabilidade genética. O vírus influenza A apresenta subtipos de acordo com as diferenças serológicas e genéticas nas suas glicoproteínas antigénicas de superfície - hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) - e nos genes que as codificam. Foram classificados 16 tipos de hemaglutinina e nove tipos de neuraminidase identificadas em diferentes espécies animais (Cox *et al.*, 1999). Atualmente são conhecidas três hemaglutininas (HA1, HA2 e HA3) e duas neuraminidasas (NA1 e NA2) presentes nos vírus influenza do tipo A, e que podem infetar os seres humanos (Cox *et al.*, 1999). De entre os subtipos de vírus influenza A, os subtipos A (H1N1) e A (H3N2) circulam atualmente em humanos.

A elevada propagação do vírus pelos vários continentes está representada na Figura 1 e contribui para a ocorrência de mutações e aparecimento de novas estirpes. Deste modo, todos

os anos, vários milhares de pessoas são hospitalizadas devido a complicações da gripe, havendo uma taxa de mortalidade considerável, em especial em indivíduos com idade superior a 65 anos e com patologias preexistentes. Assim, a prevenção passa pelo reforço anual do sistema imunitário o que é conseguido de forma rápida e efetiva mediante a aplicação de vacinas cujo objetivo é controlar ou diminuir os sinais de infecção.

O vírus influenza tem a capacidade de sofrer variações antigénicas frequentes e imprevisíveis (Cox *et al.*, 1998), o que está na origem do seu sucesso epidemiológico e o coloca numa situação de destaque entre as doenças emergentes, atingindo na Europa, Japão e Estados Unidos mais de 10,00 milhões de pessoas a cada Inverno (Oxford *et al.*, 1998). A natureza fragmentada do material genético do vírus propicia altas taxas de mutação do genoma durante a fase de replicação, possibilitando variabilidade e diversidade antigénica, além de aumentar a capacidade de adaptação do vírus. Estas mutações ocorrem de forma independente e habitualmente provocam o aparecimento de novas variantes para as quais a população ainda não apresenta imunidade, já que as vacinas anteriormente administradas ou as infeções prévias provocadas por determinada estirpe não conferem proteção contra as estirpes mais recentes do vírus (Cox *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 1999).

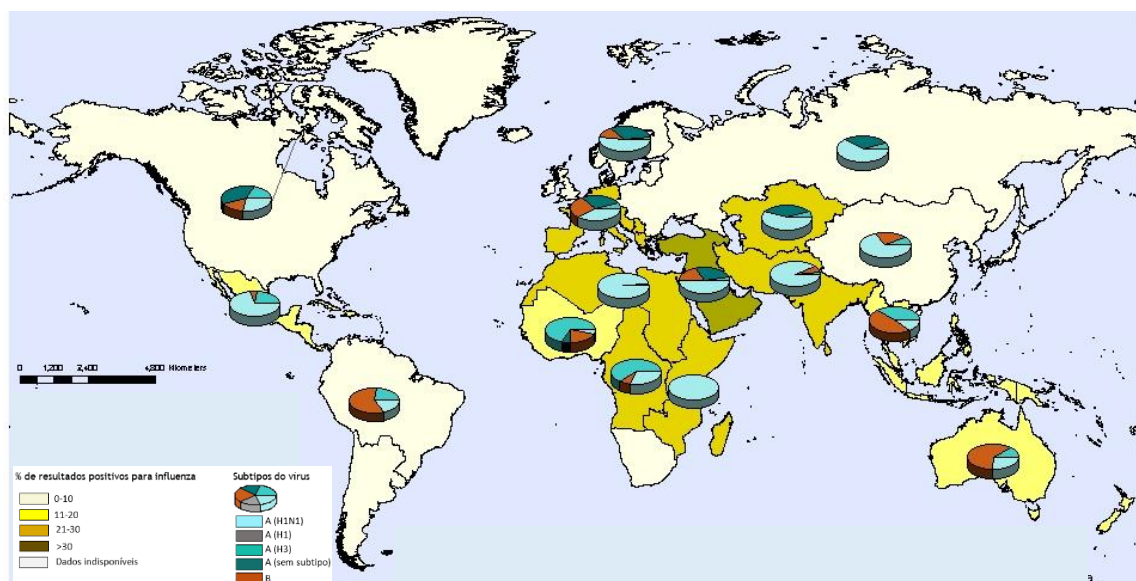


Figura 1: Percentagem de espécimes respiratórios com resultado positivo para influenza e distribuição dos subtipos do vírus a nível mundial (http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/, consultado a 09/08/2016).

O vírus influenza está então sujeito a dois tipos de variações antigénicas responsáveis pelo seu sucesso epidemiológico: as menores (*antigenic drift*) e as maiores (*antigenic shift*). As primeiras ocorrem a cada dois ou três anos para os subtipos do vírus A e a cada cinco ou seis anos para os subtipos do vírus do tipo B, e são devidas a mutações pontuais nos segmentos do genoma viral que resultam em mudanças nos aminoácidos que compõem as glicoproteínas de superfície (as hemaglutininas maioritariamente) e que promovem o aparecimento de novas variantes do vírus

que deixam de ser suscetíveis à imunidade adquirida. As variações antigénicas maiores ocorrem quando novos subtipos de influenza que normalmente infetavam apenas outras espécies animais, como suínos ou aves, são transmitidos para humanos, e estão relacionadas com a segmentação do material genético de outros vírus influenza, sempre que ocorrem infeções mistas. Isto resulta em estirpes imunologicamente distintas (Cox *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 1999) e reflete-se no aparecimento de novos vírus influenza A nos humanos contendo uma nova hemaglutinina ou hemaglutinina e neuraminidase, e que estão associados à completa substituição de um ou de ambos os segmentos do genoma viral, que controlam a produção de glicoproteínas de superfície.

Além das epidemias sazonais, os vírus influenza causam pandemias a intervalos irregulares que não podem ser previstos. A pandemia de 1918 causada pelo vírus H1N1 tirou aproximadamente 40 milhões de vidas. Depois desta, as pandemias foram causadas pelo H2N2 em 1957, pelo H3N2 em 1968 e novamente pelo H1N1 em 2009 (Krammer *et al.*, 2015). Estas pandemias são causadas pelos vírus influenza que atravessam a barreira das espécies de um reservatório animal (por exemplo de suínos os aves) e adquirem a capacidade de crescer e de se transmitirem com sucesso entre a população humana, sendo esta uma das grandes dificuldades para o controlo da disseminação dos vírus influenza, uma vez que possibilita o reagrupamento entre genes de vírus que infetam seres humanos e animais (Cox *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 1999).

1.1.1 Estrutura do vírus e organização do seu genoma

O agente etiológico da gripe é o *Myxovirus influenzae*, também designado vírus influenza, da família *Orthomyxoviridae*. Os vírus influenza são constituídos por oito segmentos de cadeia simples de RNA de polaridade negativa que se encontram enrolados num complexo macromolecular ribonucleoproteico (RNP) de dupla-hélice, estabilizada por uma cadeia nucleoproteína-RNA (Wenjie *et al.*, 2013; Knipe *et al.*, 2001). Cada ribonucleoproteína contém RNA viral, uma polimerase heterotrimérica viral (constituída por subunidades de proteínas PA, PB1 e PB2) e múltiplas cópias de nucleoproteína (NP) codificada por vírus que se liga ao RNA viral (Wenjie *et al.*, 2013; Compans *et al.*, 1972; Heggenss *et al.*, 1982; Jennings *et al.*, 1983; Ruigrok *et al.*, 1995; Moeller *et al.*, 2012).

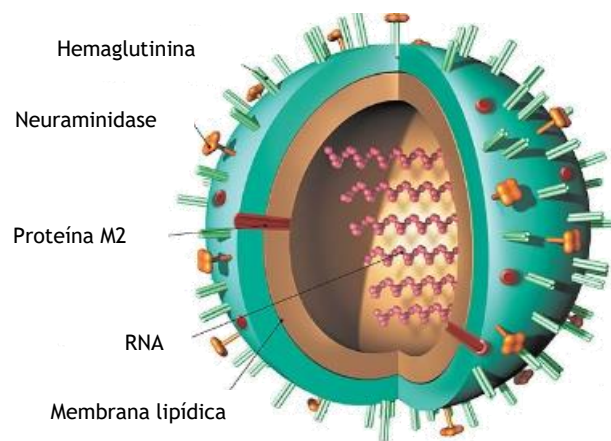


Figura 2: Modelo da estrutura do vírus influenza (adaptado de Klimov et al., 2012).

Os vírus influenza são partículas pleomórficas esféricas, com diâmetro que varia entre 80 a 120 nm (Lamb *et al.*, 2001; Ruigrok *et al.*, 1998) com uma camada externa de, aproximadamente, 500 projeções com a forma de espigões que representam o envelope de glicoproteínas hemaglutinina (em forma de haste) e neuraminidase (com forma semelhante a cogumelos) (Ruigrok *et al.*, 1998). O espigão de hemaglutinina é um trímero, constituído por monómeros de HA (Steinhauer *et al.*, 1998), enquanto, por sua vez, o espigão de neuraminidase é um tetrâmero (Colman *et al.*, 1998; Varghese *et al.*, 1998). Na estrutura do vírus influenza, representada na Figura 2, a hemaglutinina é cerca de quatro vezes mais abundante que a neuraminidase.

A hemaglutinina é o maior antígeno do vírus: é o glicopéptido viral de superfície responsável pela entrada do vírus nas células do hospedeiro (Krammer *et al.*, 2015). Deste modo, a inibição da hemaglutinação bloqueia a ligação do seu domínio globular aos recetores celulares e tem correlação direta com a proteção contra o vírus.

A neuraminidase (NA) é uma glicoproteína viral de superfície homotetramérica com atividade sialidase e é responsável pela saída do vírus da célula infetada, permitindo a sua propagação. A neuraminidase auxilia no transporte do vírus através das superfícies das mucosas e medeia a libertação do vírus da superfície celular.

É de referir ainda a existência da proteína matricial M2, um canal proteico transmembranar responsável pela replicação do vírus (Park *et al.*, 2011), da nucleoproteína (NP) que auxilia no progresso da polimerase durante a fase de alongação e tem um papel preponderante na organização estrutural e estabilização das ribonucleoproteínas (Turrell *et al.*, 2013; Wenjie *et al.*, 2013) e da proteína não estrutural (NS1) que também pode regular a síntese de RNAs virais.

A replicação e transcrição do genoma do vírus influenza A ocorrem no núcleo das células infectadas e são levadas a cabo pelas ribonucleoproteínas nas quais cada segmento do RNA está associado a monómeros da nucleoproteína e a uma polimerase dependente do RNA.

A nucleoproteína do vírus influenza A é uma proteína multifuncional que interage com determinadas proteínas virais (PB1, PB2, M1, etc) e do hospedeiro (RAF-2p48/UAP56 e Tat-SF1), melhorando a eficiência da replicação (Portela *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2010,0) (Newcomb *et al.*, 2009). As nucleoproteínas são necessárias para permitir a síntese de ribonucleoproteínas: funcionam como sítios de ligação de RNA e revestem o RNA viral de modo a facilitar o seu enrolamento numa estrutura ribonucleoproteica em dupla-hélice (Ng A.K. *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2012).

O complexo polimerase do vírus influenza A representa a maquinaria nuclear para a replicação e transcrição do RNA viral (Lamb *et al.*, 2001; Martin-Benito *et al.*, 2001; Area *et al.*, 2004; Coloma *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 1998; Mena *et al.*, 1999; Poch *et al.*, 1989; Biswas *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1996; Wunderlich *et al.*, 2009)

1.1.2. Vacinação contra o vírus influenza

Nas últimas décadas, a imunização anual com vacinas inativadas contra influenza tem sido a principal medida para a profilaxia da gripe, sendo que, atualmente, cerca de 180 a 200 milhões de doses de vacina são distribuídas e administradas a cada ano (Ambrosch *et al.*, 2000).

As vacinas contra o vírus influenza A e B foram utilizadas pela primeira vez em 1940, eram vacinas do vírus inativado e geradas em ovos de galinha embrionados, um processo eficiente mas muito demorado que ainda hoje é utilizado (Wilkinson *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2010,0). Este processo que compreende a propagação do vírus, purificação, inativação e produção da vacina leva entre 6 a 9 meses até estar concluído o que, num caso pandémico, se torna problemático (Krammer *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2009; Wu J *et al.*, 2010,0). Esta tecnologia baseia-se em viriões inativados quimicamente, com formalina, nitrato de fenilmercúrio e β-propiolactona, ou, fisicamente, com luz ultravioleta (Krammer *et al.*, 2015). As vacinas inativadas são seguras e imunogénicas, conduzindo a uma resposta imune a cerca de 60 a 90% de crianças e adultos (Feng *et al.*, 2009; Wilkinson *et al.*, 2012). Quando uma nova pandemia do vírus é identificada a nova vacina leva meses a desenvolver, testar, distribuir e administrar e, após a vacinação de um indivíduo, leva mais duas a três semanas até que haja uma resposta imunitária por parte do organismo. Esta limitação, conjuntamente com o complicado processo de produção, o risco zoonótico associado e a limitada proteção imunológica levam a que o processo deva ser desenvolvido e melhorado, para aumentar a capacidade de resposta em situações de pandemia. Na Figura 3 está representado o processo de produção da vacina do vírus influenza. As estrelas amarelas assinalam os passos que podem ser acelerados pela

utilização de novas tecnologias. A fase de seleção das estirpes pode ser facilitada pela síntese de genes, genética reversa e sequenciação, a fase de produção pode ser acelerada por um novo processo de produção mais fácil de transpor para larga escala (por exemplo pela tecnologia das proteínas recombinantes) e a fase de purificação pode ser facilitada por novos métodos de purificação, como por exemplo, os criogéis.

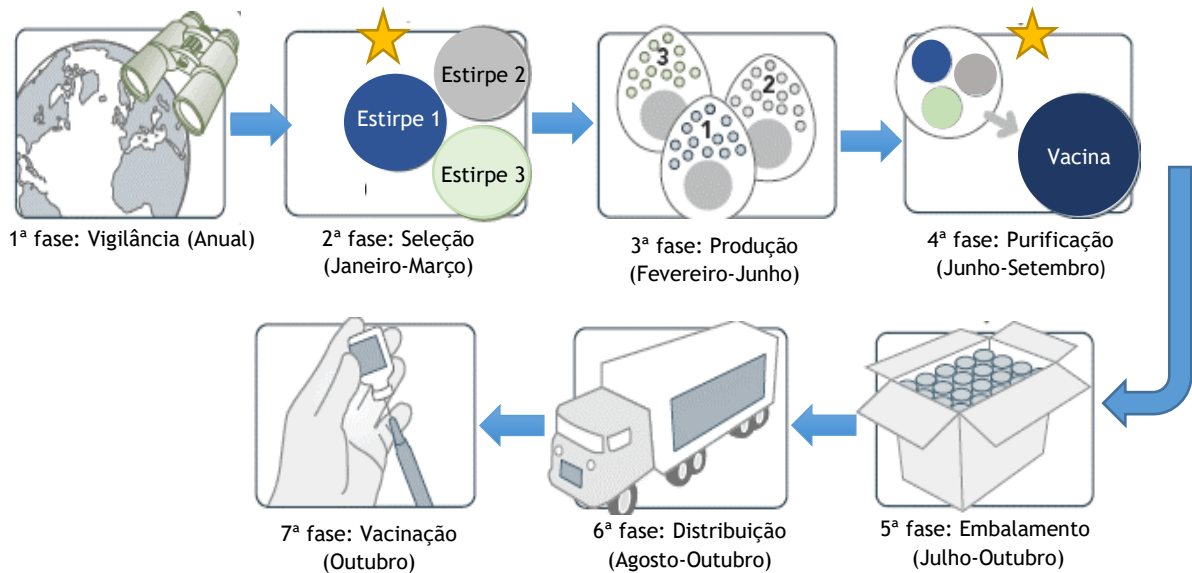


Figura 3: Processo de produção da vacina do vírus influenza (Adaptado de Tosh *et al.*, 2010,0).

As proteínas hemaglutinina e neuraminidase são os alvos primários dos anticorpos das vacinas. Os anticorpos que reagem contra a hemaglutinina neutralizam a capacidade de infecção do vírus e os anticorpos contra a neuraminidase modificam a severidade da doença. As vacinas contra o vírus influenza desencadeiam uma resposta anti hemaglutinina específica para cada estirpe.

No entanto, devido à evolução antigénica das estirpes de influenza (*antigénic drift*) estas vacinas não protegem contra as novas estirpes que aparecem a cada ano e têm um estreito espectro de atuação, conferindo imunidade apenas contra determinadas estirpes específicas do vírus e, por isso, têm de ser atualizadas e reformuladas todos os anos. Anualmente são escolhidas as estirpes do vírus a serem incorporadas nas vacinas, através da previsão de quais as estirpes que causarão, com maior probabilidade, uma epidemia no ano seguinte, a sua proximidade às estirpes atuais e a sua capacidade de causar a imunidade humoral correta e a sua adequação a produção em larga-escala (Klimov *et al.*, 2011). Posteriormente, as vacinas são produzidas e os vírus inativados são inseridos e crescem em ovos de galinha embrionados.

Atualmente há quatro tipos de vírus influenza a circular entre a população humana: dois são parte dos vírus influenza A (o H1N1 e o H3N2) e os outros dois são duas linhagens divergentes do vírus influenza B (Krammer *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2009). Foi estipulado, em 1977, na sequência da pandemia de 1968 que a composição para a vacina da gripe deve incluir pelo menos 3 estirpes do vírus: duas do tipo A (dos subtipos H1N1 e H3N2) e uma do tipo B (Dab *et*

al., 1991; Hannoun *et al.*, 1989; Allison *et al.*, 1977). Estas vacinas são chamadas de vacinas inativadas trivalentes (TIVs) (Krammer *et al.*, 2015). Atualmente foi feito um melhoramento às vacinas sazonais contra o vírus influenza, com a inclusão de uma segunda estirpe de Influenza B, dando origem às vacinas um carácter quadrivalente (Allison *et al.*, 1977).

Além das vacinas de influenza inativadas (IIVs) existem as vacinas ativas atenuadas (LAIVs), administradas por spray nasal, que se replicam no trato respiratório alto (Davenport *et al.*, 1964). Estas vacinas são utilizadas principalmente em crianças e apresentam uma eficácia de 83% (Tricco *et al.*, 2013). A principal vantagem deste tipo de vacinas é a capacidade para induzir uma resposta imune mucosa, para além da resposta humoral e celular sistémica, e a sua facilidade de administração e aceitabilidade (Davenport *et al.*, 1964).

Como alternativa às vacinas convencionais, a utilização do pDNA como uma vacina não viral tem-se tornado numa potencial estratégia terapêutica para prevenir ou tratar determinadas doenças de forma menos invasiva e segura comparativamente aos vetores virais. As vacinas de DNA contra o vírus influenza podem ser uma útil e poderosa alternativa às terapias convencionais, uma vez que têm baixo custo de produção, estabilidade, simplicidade na formulação e segurança (Sun *et al.*, 2010,0) e uma velocidade de produção de duas semanas, muito superior à requerida para as vacinas convencionais (Klimov *et al.*, 2011). O desenvolvimento desta tecnologia começou quando os investigadores foram confrontados com a baixa imunogenicidade das vacinas convencionais, de proteção reduzida e que desaparece após um certo período de tempo (Wilkinson *et al.*, 2012). As vacinas de pDNA consistem numa dupla cadeia de DNA circular com uma ou mais sequências de DNA de proteínas específicas de influenza, capazes de induzir ou elicitar uma resposta imune contra as infeções gripais. Deste modo, pode ser utilizada uma mistura de plasmídeos para ampliar o espectro de proteção da vacina (Luke *et al.*, 2009). O processo de fabrico destas vacinas é independente de ovos, o controlo de qualidade é mais simples e a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas podem ser facilmente armazenadas à temperatura ambiente, após serem liofilizadas (para aumentar a estabilidade do DNA) (Sun *et al.*, 2010,0), ao contrário das vacinas convencionais que têm de ser armazenadas a baixas temperaturas (2°C a 8°C) (Kim *et al.*, 2011). Deste modo, as vacinas recombinantes produzidas em bactérias, sem outros componentes celulares ou virais, têm menos complicações imunológicas relativamente às vacinas virais, como reações piogénicas. Como evidência da natureza promissora desta terapia, recentemente têm sido desenvolvidas vacinas de pDNA que estão em fases de testes em animais (Kim *et al.*, 2012; Ault *et al.*, 2012; Aguilar-Yanes *et al.*, 2010,0; Ledgerwood *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2010,0; Wiesener *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2010,0; Tan *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2009; Guionie *et al.*, 2014) e humanos (Jones *et al.*, 2009; Khurana *et al.*, 2013; Ledgerwood *et al.*, 2011; Ledgerwood *et al.*, 2012; Ledgerwood *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2010,0).

As vacinas convencionais apenas têm a capacidade de estimular a imunidade humoral (Kennedy *et al.*, 2010,0), sendo assim ineficazes na imunidade mediada por células. Deste modo, apenas ativam uma parte do sistema imunitário, contrariamente às vacinas de DNA que têm a capacidade de induzir uma resposta imunitária celular através da produção de linfócitos T auxiliares (CD4+) e linfócitos T citotóxicos (CD8+) e também uma resposta humoral por produção de linfócitos B (Turrell *et al.*, 2013), levando a uma resposta imunológica forte e prolongada (Kim *et al.*, 2013).

Para poderem ser consideradas uma alternativa comercial, as vacinas de DNA devem ser produzidas de forma massiva, permitir a máxima expressão dos antígenos codificados e não revelarem perigo para os hospedeiros humanos. Uma das maiores preocupações quando se trabalha com pDNA não é apenas o risco de inserção no genoma humano mas também a possibilidade de indução de tolerância imunológica pelos antígenos expressos no hospedeiro. (Khan *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010,0). Da mesma forma, como os plasmídeos não reconhecem alvos específicos nas células podem desencadear o potencial autoimune do hospedeiro e sofrer degradação antes de entrar nas células, requerendo, por esse motivo, sistemas de entrega (Koutsonanos *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2012).

Os sistemas de expressão para as vacinas contra o vírus influenza, incluem baculovirus, sistemas de expressão em células de insetos; *Agrobacterium*; a planta *Nicotiana* e o sistema de expressão bacteriano *Escherichia coli*, bem como espécies de *Lactobacillus*, algas e leveduras. As hemaglutininas expressas em células de insetos e células de plantas enrolam corretamente e são similares às expressas em células de mamífero. Pelo contrário, a hemaglutinina expressa em *Escherichia coli* não está glicosilada, forma corpos de inclusão e precisa de ser enrolada posteriormente (modificações pós-transducionais) (Davenport *et al.*, 1964).

Atualmente, os anticorpos direcionados para as moléculas de neuraminidase não previnem a ligação e entrada do vírus influenza nas células mas limitam a disseminação do vírus e aumentam a imunidade contra ele. Por outro lado, os anticorpos anti hemaglutinina neutralizam a infetividade do vírus (Ault *et al.*, 2012; Agguilar-Yanez *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010,0; Tan *et al.*, 2010,0; Wiesener *et al.*, 2011).

De acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde, as vacinas trivalentes contra a gripe para a época 2015-2016, no Hemisfério Norte, têm a seguinte composição:

- uma estirpe viral A(H1N1) idêntica a A/California/7/2009
- uma estirpe viral A(H3N2) idêntica a A/Switzerland/9715293/2013
- uma estirpe viral B (linhagem Yamagata) idêntica a B/Phuket/3073/2013 (Vacinação contra a gripe com a vacina trivalente para a época 2015/2016, direção geral de saúde, 2015)

Atualmente as vacinas comercializadas em Portugal para o vírus da gripe são a Flud®,
Fluarix®, Inflexal V®, Influvac®, Istivac® e Istivac infantil®.

1.2. Terapias baseadas em DNA

A investigação na área da genética teve um grande desenvolvimento em 1944, quando Avery descobriu que o DNA contém informação genética (Avery *et al.*, 1944). Quase 10,0 anos depois, em 1953, Watson e Crick descobriram a estrutura do DNA em dupla hélice (Watson *et al.*, 1993) e em 2001, a descodificação do genoma humano, trouxe um maior conhecimento das doenças relacionadas com os genes. A rápida expansão do conhecimento sobre mecanismos de doenças, combinada com a facilidade e baixo custo de manipulação do DNA, permitiu que a tecnologia do DNA recombinante fosse aplicada em terapias baseadas em DNA, como estratégia para tratar doenças graves, muitas delas consideradas incuráveis até à data, como doenças neurodegenerativas, tumorais, cardiovasculares e infecciosas como o síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e as doenças monogénicas ou genéticas de cariz hereditário (Verma *et al.*, 1997; Naldini *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2009; Kolbet *et al.*, 2013; Wirth *et al.*, 2013).

O baixo custo associado a estas terapias baseadas em DNA permite que estas sejam acessíveis a mais pessoas, reduzindo a mortalidade mesmo em países subdesenvolvidos. A Figura 4 representa graficamente as maiores áreas de incidência da terapia baseada em DNA, sendo as doenças cancerígenas aquelas com maior destaque.

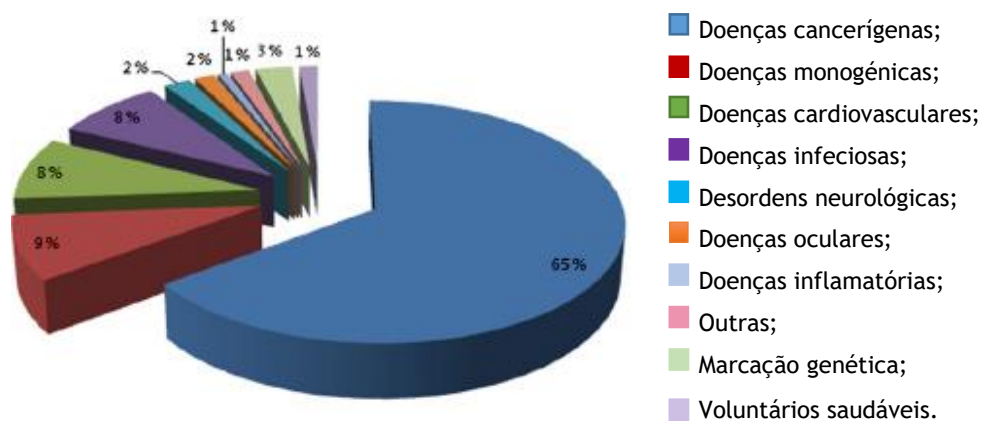


Figura 4: Representação gráfica das maiores áreas de incidência da terapia baseada em DNA (adaptado de Wirth *et al.*, 2013).

Num contexto terapêutico, a terapia génica e as vacinas de DNA, representadas na Figura 5, surgiram como duas abordagens exploradas na terapêutica baseada na utilização do DNA uma vez que, relativamente a fármacos convencionais, estas apresentam a vantagem de serem mais seguras (Gaspar *et al.*, 2015) e seletivas (Patil *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2009). A terapia génica permite a síntese de novas proteínas que possam corrigir um defeito associado a uma dada patologia (Ibraheem *et al.*, 2014) enquanto as vacinas de DNA induzem uma resposta

imunológica na ausência de infecção através da introdução de genes que codificam antígenos de agentes patogênicos específicos (Patil *et al.*, 2005).

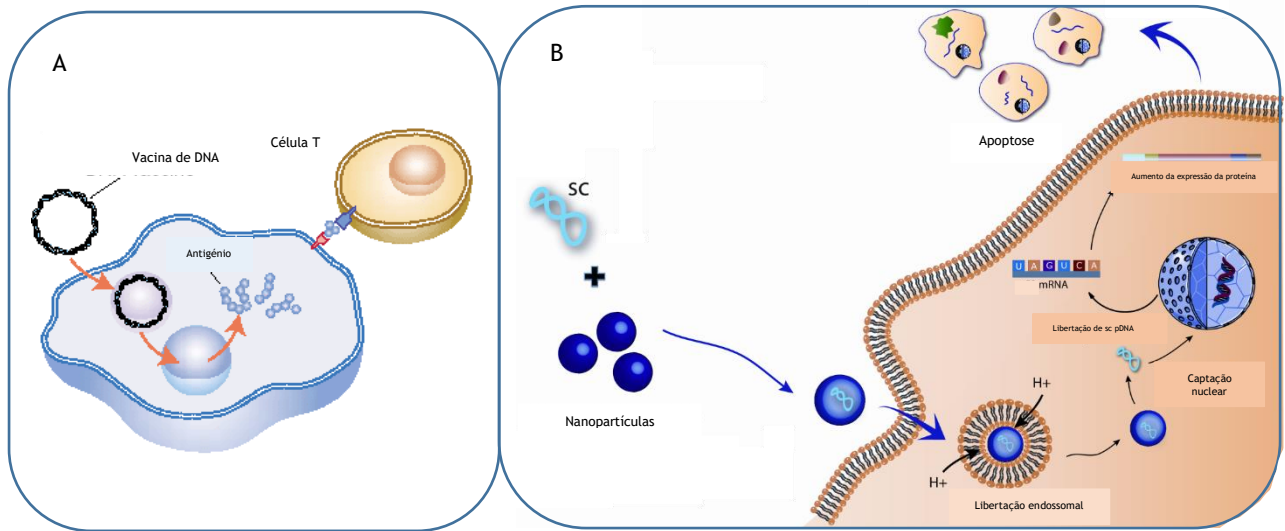


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de atuação das vacinas de DNA (A) e da Terapia génica (B) (Adaptado de Gaspar *et al.*, 2011).

1.2.1. Terapia génica

Os genes, como unidade funcional da hereditariedade, representam sequências específicas de bases que codificam instruções para sintetizar proteínas. Quando os genes estão alterados, as proteínas codificadas não funcionam corretamente e este desequilíbrio pode resultar em doenças genéticas, uma vez que as proteínas são responsáveis pelo desempenho das funções vitais. Neste sentido, os avanços na área da Biotecnologia permitiram que a terapia génica tenha conquistado uma posição de destaque na área da investigação médica (Orkin *et al.*, 1986; Gardlik *et al.*, 2005). A terapia génica, utilizada em humanos desde a década de 80 (Kaufmann *et al.*, 2013), consiste na entrega de material genético exógeno a células-alvo específicas com o objetivo de estas passarem a expressar o gene e de gerar um efeito terapêutico, através da substituição de um gene disfuncional por um gene funcional que irá permitir a expressão correta da proteína e, conseqüentemente, impedir a progressão da doença que se pretende tratar (Zhang *et al.*, 2004; Kendirci *et al.*, 2006). Este efeito é conseguido através da correção do defeito existente ou dando às células uma nova função (Rubanyi *et al.*, 2001).

A terapia génica difere das terapêuticas tradicionais à base de fármacos, que podem tratar os sintomas mas não têm em conta os problemas genéticos do paciente. Além disto, representa uma alternativa viável aos fármacos convencionais, uma vez que é mais económica, tem alta especificidade, maior biodisponibilidade e permite um tempo prolongado de atuação, o que vai permitir uma resposta menos agressiva por parte do hospedeiro e um direcionamento mais

eficaz para as células-alvo (Sousa *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2002). Por este motivo, em teoria, qualquer doença que tenha por base um defeito genético pode ser tratada por terapia génica embora, em prática, as doenças genéticas causadas por mutações em genes específicos sejam mais simples de tratar com esta técnica que as doenças que envolvem vários genes e/ou fatores ambientais (Brown *et al.*, 2001; Sousa *et al.*, 2014; Stone *et al.*, 2010,0).

Existem duas grandes áreas nas quais a terapia génica pode, em teoria, ser aplicada: a terapia génica na linha germinativa e a terapia génica nas células somáticas, referindo-se a primeira ao melhoramento de disfunções genéticas através da manipulação direta nas células germinais, e a segunda à inserção de genes em células diplóides, de modo a que as alterações não sejam transmitidas às gerações seguintes (Wirth *et al.*, 2013).

Sendo a terapia génica para aplicação em humanos, levanta questões éticas, bem como preocupações relacionadas com a sua segurança e possíveis efeitos secundários no paciente. Deste modo, e apesar da terapia génica na linha germinativa ter um enorme potencial, esta terapêutica é alvo de um controlo apertado por parte de agências reguladoras, sendo que, atualmente, a legislação limita a terapia génica à aplicação em células somáticas (Wirth *et al.*, 2013; MacDonough, *et al.*, 1997; Resnik, *et al.*, 2001).

A terapia génica pode ser aplicada *in vivo* e *ex vivo*. No primeiro caso, os genes são administrados diretamente ao paciente; no segundo, são primeiro recolhidas as células do paciente, nas quais o material genético é incorporado e são novamente administradas ao paciente (Kaufmann *et al.*, 2013).

Para o sucesso da terapia génica deve haver uma prévia identificação do gene em falta, devem ser identificadas e estar acessíveis as células específicas que requerem tratamento, e devem ser desenvolvidos sistemas de entrega do gene às células, onde é incorporado no material genético do hospedeiro. Para garantir um efeito terapêutico por um período de tempo mais prolongado deve assegurar-se que o gene terapêutico permanece no núcleo da célula, local onde será replicado e, posteriormente, transmitido às células que estão a ser originadas durante a divisão celular (Gardlik *et al.*, 2005). Deste modo, a célula poderá expressar uma nova informação genética e sintetizar uma nova proteína que é excretada para o meio extracelular de modo a desempenhar a sua função terapêutica (Ibraheem *et al.*, 2014; Kendirci *et al.*, 2006; Glover *et al.*, 2005).

O sucesso da terapia génica depende da sua capacidade de ultrapassar obstáculos para expressar eficientemente os genes alvo no núcleo da célula sem serem degradados e, para atingir este objetivo, podem ser utilizados vetores como sistemas de entrega (Naldini *et al.*, 2015; Avery *et al.*, 1944; Zhang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2002; Ibraheem *et al.*, 2014).

1.2.2. Vacinas de DNA

Todos os anos doenças graves fazem vítimas por todo o mundo (Gurunathan *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Rice *et al.*, 2008).

Apesar de se terem feito importantes avanços e melhoramentos nas vacinas convencionais, a partir do momento em que uma pessoa é infetada, são necessárias respostas imunológicas celulares e mais prolongadas, como as desencadeadas pelas vacinas de DNA, desenvolvidas pela biotecnologia e produzidas em *Escherichia coli* (Wirth *et al.*, 2013). As vacinas de DNA baseiam-se na tecnologia do DNA recombinante e envolvem a transferência num plasmídeo bacteriano com informação genética a ser expressa pelas células eucarióticas do paciente para produção de uma proteína antigénica que irá induzir uma resposta imunológica contra um agente patogénico em específico (Savers *et al.*, 2007; Colluru *et al.*, 2013), para o tratamento da doença (Poláková *et al.*, 2010,0; Khan *et al.*, 2013). As vacinas de DNA são versáteis e capazes de estimular as respostas imunológicas, celular e humoral, sem que tenha havido uma infeção prévia (Yin X. *et al.*, 2015), levando a cabo ações preventivas e terapêuticas (Flingai *et al.*, 2013). Os estudos referentes às vacinas de DNA revelam diversas vantagens destas vacinas relativamente às convencionais, nomeadamente uma maior segurança, facilidade de produção e especificidade, baixo custo, resposta imunitária focada no antigénio de interesse, possibilidade de utilização de uma mistura de plasmídeos permitindo um maior espectro de aplicação, inexistência de risco de retorno para as formas virulentas, desencadeamento de uma ação prolongada, estabilidade de armazenamento, resistência ao calor e facilidade de manipulação (Khan *et al.*, 2013; Colluru *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014; Flingai *et al.*, 2013).

Uma das principais diferenças destas vacinas relativamente às convencionais é a sua capacidade de transportar regiões altamente conservadas, o que permite um combate mais eficaz contra agentes patogénicos que tenham sofrido alterações, como a síndrome de imunodeficiência adquirida e o vírus influenza (Resnik *et al.*, 2001; Flingai *et al.*, 2013). As vacinas de DNA utilizadas para tratar a gripe das aves provocada pelo vírus influenza, são responsáveis por destacar a importância deste tipo de vacinas e a necessidade de otimizar os seus processos de produção já que, podendo ser produzidas em duas a três semanas, salvam milhares de vidas, em caso de pandemia (Einstein *et al.*, 2011).

A primeira vacina de DNA remonta a 1990 por John Wolf que usou um plasmídeo que codificava a proteína α -glicosidase expressa após inoculação direta num músculo de rato e avaliou a eficiência de transfeção e a imunogenicidade correspondente, conferida pelo plasmídeo (Wolf *et al.*, 1990). Três anos depois, foi levada a cabo uma experiência semelhante em ratos, mas utilizando DNA que codificava as proteínas imunogénicas do vírus influenza: hemaglutinina e neuraminidase (Ulmer *et al.*, 1993).

O sucesso da imunização com DNA depende, principalmente, da natureza dos antígenos, da frequência e da via de administração, da concentração de DNA administrado, da localização celular do antígeno codificado pelo plasmídeo (ligado à membrana ou citoplasmático) e da idade e estado físico do paciente a ser vacinado (Kennedy *et al.*, 2010,0; Kong *et al.*, 2006). Os adjuvantes têm sido uma alternativa bastante explorada para aumentar a eficiência destas vacinas, sendo as citocinas (Li *et al.*, 2013), a interleucina-2 (Colluru *et al.*, 2013), a vaxfectina (Khan *et al.*, 2013), as enterotoxinas termolábeis (Xu *et al.*, 2014), os exemplos mais explorados.

A administração de vacinas de DNA pode ser intramuscular, subcutânea ou oral, de modo a que o material genético consiga aceder às células alvo e possa desencadear um largo espectro de respostas imunes (Li *et al.*, 2013). Após a administração da vacina ocorre a transfeção, na qual as células do organismo incorporaram no seu núcleo o material genético transfetado e que permite a codificação de um antígeno específico. No sistema linfático as células citotóxicas (células T CD8+) reconhecem o antígeno através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) I, que tem a capacidade de eliminar células infetadas. As células somáticas transfetadas secretam o antígeno adquirido que é reconhecido pelas células T auxiliares (células T CD4+) que por sua vez libertam citocinas e têm uma função regulatória na produção de anticorpos no complexo de histocompatibilidade II. Este processo, por sua vez, leva à ativação das células B havendo, assim, produção de anticorpos, que permitem uma resposta mais eficaz numa infeção posterior (Saade *et al.*, 2012; Abdulhaqq *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2010,0; Kennedy *et al.*, 2010,0; Liu *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2011). No início do processo as células somáticas podem sofrer apoptose. Neste caso, os antígenos constituintes das células apoptóticas e os antígenos libertados durante a morte celular programada são incorporados pelas células apresentadoras de antígenos, passando a seguir-se a via do complexo de histocompatibilidade I (Liu *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2014).

1.2.3. Sistemas de entrega de genes

As vacinas de DNA apresentam baixas imunogenicidade e eficiência de transfeção (Khan *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). O sucesso da terapia génica e das vacinas de DNA depende da entrega bem sucedida do material genético à célula-alvo, órgãos ou tecidos, de forma eficiente, sem biodegradação, para que atinja elevados níveis de expressão (Li *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2000). Os sistemas de entrega funcionam assim como um modo eficaz e seletivo para transportar o DNA até à célula pretendida (Li *et al.*, 2000), protegendo-o de potenciais obstáculos durante o percurso (Ibraheem *et al.*, 2014) que podem surgir durante o transporte, ou ao redor da célula alvo, sendo que, junto da mesma, pode não ocorrer uma captação eficiente do DNA transportado, uma separação adequada do complexo sistema de entrega-DNA no interior da

célula ou um direcionamento correto do DNA para o núcleo da célula (Li *et al.*, 2000; Gardlik *et al.*, 2005).

Nos anos 90 foram desenvolvidos vetores que expressam genes em células de mamífero (Azevedo *et al.*, 1999). Para garantir a máxima eficiência, o vetor deve cumprir alguns pré-requisitos como dispor de dimensões que permitam a passagem pela membrana celular e a entrada no núcleo, ausência de interações com células vasculares e endoteliais (imunologicamente inerte) e capacidade de evasão à captura pelo sistema reticuloendotelial, bem como de codificar sequências de grande tamanho (Ibraheem *et al.*, 2014). Além disto deve ser específico, capaz de entregar eficientemente um ou mais genes, não ser reconhecido pelo sistema imunitário, ser fácil de produzir em larga escala e com baixo custo associado e ser purificado em grandes quantidades e elevada concentração. Considera-se que um dos fatores essenciais a ter em consideração no que respeita aos vetores utilizados é o direcionamento. Isto é, deve garantir-se que conseguem contornar barreiras biológicas e deslocar-se unicamente para as células-alvo. No caso de ocorrer transfeção em células não desejadas, há um risco acrescido de graves consequências clínicas adversas (Bouard *et al.*, 2009). Uma vez que o vetor é inserido no paciente não deve induzir uma reação alérgica nem inflamatória; deve ser seguro não apenas para o paciente, mas também para o meio ambiente e capaz de expressar o gene no organismo pelo tempo que for necessário, geralmente durante a vida do paciente (Glenting *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2010,0; Coelho *et al.*, 2010,0).

Os vetores podem ser virais e não virais. Relativamente aos primeiros, existem algumas questões relacionadas com a segurança que comprometem a sua utilização e que tornaram os vetores não virais uma opção mais atraente à luz da ciência atual (Liu *et al.*, 2002; Ibraheem *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2010,0).

1.2.3.1. Vetores virais

Os vírus constituem os sistemas de entrega de genes mais utilizados em terapia génica por terem a capacidade de infetar células hospedeiras, utilizando a sua maquinaria celular para se replicarem. Os vetores virais são então considerados um dos sistemas de entrega de DNA mais eficiente, por terem uma elevada capacidade de direcionamento e transferência de genes (Edelstein *et al.*, 2016; Munier *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2010,0). Para serem utilizados como vetores deve modificar-se o genoma dos vírus substituindo genes não essenciais do vírus por genes terapêuticos de modo a evitar a expressão dos genes virais e eliminar a sua patogenicidade, tornando-os mais seguros mas preservando a sua eficiência de transfeção (Thomas *et al.*, 2003; Bouard *et al.*, 2009; Gardlik *et al.*, 2005). No entanto, esta categoria de vetores levanta algumas questões como a imunogenicidade que pode advir da sua utilização

repetida, risco de ativação de oncogenes e elevados custos associados (Sousa *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2000).

Os principais tipos de vírus usados em terapia génica são os adenovírus e vírus simplex (derivado do herpes) cujo genoma não integra o da célula que está a ser infetada (Bouard *et al.*, 2009), o que leva a altos níveis de expressão em menor tempo (Lentz *et al.*, 2013; Bouard *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010,0; Ceccherini-nelli *et al.*, 2013); os vírus adeno-associados, lentivírus e retrovírus cujo genoma é integrado no da célula hospedeira como parte do seu ciclo celular, promovendo maiores tempos de expressão e induzindo uma resposta mais prolongada (Lentz *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2010,0; Bouard *et al.*, 2009; Kantor *et al.*, 2015; Ceccherini-nelli *et al.*, 2013); o lentivírus tem origem no vírus da imunodeficiência pelo que apresenta problemas de segurança, o que limita a sua aplicação clínica (Huang *et al.*, 2011; Katare *et al.*, 2010,0; Wickham, *et al.*, 2003; Ratko *et al.*, 2003).

1.2.3.2. Vetores bacterianos

Os sistemas de entrega bacterianos consistem na entrada da bactéria em células-alvo como sistema de entrega de DNA, através da sua entrada na célula por fagocitose (macrófagos ou células dendríticas) ou através de pinocitose (células não fagocíticas). Depois da sua entrada na célula o DNA é expresso, amplificando a resposta imunológica contra o antigénio e a bactéria sai por endocitose (Vassaux *et al.*, 2006; Palffy *et al.*, 2006; Seow *et al.*, 2009). Existem no entanto algumas questões relacionadas com a sua aplicação como a sua potencial toxicidade, preocupação com a não patogenicidade da bactéria transferida, rápida eliminação por parte do sistema imunitário e reações autoimunes (Palffy *et al.*, 2006).

1.2.3.3. Vetores não virais

Apesar da elevada taxa de transfeção associada aos vetores virais, estes apresentam algumas questões relacionadas com a sua segurança e, desse modo, surgiram os vetores não virais como uma alternativa mais segura (Wolff *et al.*, 1990; Sousa *et al.*, 2009; Glover *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2000). As suas taxas de transfeção e expressão génica mais baixas (por serem degradados *in vivo* por células fagocíticas e nucleases extracelulares) é compensada pela sua aplicação segura, estável e com grande biodisponibilidade, permitindo a sua produção em larga escala, o que os torna mais efetivos na entrega de genes (Gaspar *et al.*, 2015; Baban *et al.*, 2010,0; Nagasaki *et al.*, 2007). Para além disso, relativamente aos vetores virais, transportam maior quantidade de DNA (Glover *et al.*, 2005) e permitem uma administração repetida, e a nível tóxico, sem implicar uma resposta imune subsequente (Sousa F. *et al.*, 2009; Foldvari *et al.*, 2015; Munier *et al.*, 2005; Nayerossadat *et al.*, 2012).

Esta classe de sistemas de entrega engloba três principais tipos de vetores: os plasmídeos, os cosmídeos e os cromossomas artificiais (Gaspar *et al.*, 2015). Dos referidos anteriormente, o pDNA é o mais utilizado e inúmeros estudos têm sido desenvolvidos com recurso a esta tecnologia inovadora (Sousa *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2010,0; Silva *et al.*, 2008; Al-dosari *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012; Stryjewska *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2013; Gaspar *et al.*, 2014). Os plasmídeos existem naturalmente em bactérias e têm a capacidade de se replicarem autonomamente do hospedeiro. A bactéria mais utilizada para a sua produção nas plataformas biotecnológicas é a *Escherichia coli*. O pDNA tem natureza hidrofílica e aniónica, devido à presença de grupos fosfatos da cadeia dupla de DNA o que, aliado ao seu tamanho alargado, permite que passe de forma passiva através da membrana plasmática (Sousa *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2010,0). Para além disso, o DNA encontra-se extremamente compactado, resultando numa estrutura superenrolada. Esta estrutura apresenta uma zona exterior mais hidrofílica, em consequência da presença dos açúcares e do grupo fosfato e um interior mais hidrofóbico devido às interações e disposições das bases da dupla hélice do DNA (Sousa *et al.*, 2008). As características do pDNA implicam um controlo rígido de condições como o pH e a temperatura, dado que podem ocorrer interações como as eletrostáticas e hidrofóbicas, que podem culminar na sua degradação e consequente perda de função (Sousa *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2010,0; Valente *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2014).

1.2.3.4. Métodos físicos de entrada de DNA

As características da célula-alvo e os obstáculos extracelulares, bem como a natureza, carga, tamanho, hidrofobicidade e conformação do pDNA, podem promover interações instáveis, dificultando o acesso do DNA à célula-alvo (Li *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2010,0). Deste modo, para ultrapassar a baixa capacidade de transfeção do pDNA e facilitar o acesso do material genético à célula foram desenvolvidos métodos físicos para transportar os genes terapêuticos às células-alvo, protegendo-os da degradação pelas nucleases (Al-dosari *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2000; Baban *et al.*, 2010,0). Estes métodos baseiam-se na rutura da membrana por meios mecânicos, elétricos, ultrassónicos, hidrodinâmicos ou baseados em energia laser, de modo a facilitar a entrada do DNA na célula-alvo (Stone *et al.*, 2010,0; Al-dosari *et al.*, 2009; Ibraheem *et al.*, 2014). Estas técnicas incluem a injeção direta, a eletroporação, o ultrassom, a injeção hidrodinâmica e a injeção balística de DNA (Patil *et al.*, 2005; Al-dosari *et al.*, 2009).

Cada uma das técnicas tem vantagens e desvantagens, cabendo ao investigador escolher a mais apropriada ao propósito a que é destinada (Wolff *et al.*, 1990; Stryjewska *et al.*, 2013; Patil *et al.*, 2005; Mehier-Humbert *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2007; Cevher *et al.*, 2012).

1.2.3.5. Métodos químicos de entrada de DNA

Os métodos químicos utilizam materiais de origem natural ou sintética que protegem as moléculas de DNA, permitindo uma redução do seu tamanho e carga, o que facilita a sua entrada na célula (Al-dosari *et al.*, 2009). Estas moléculas vão conferir uma maior proteção ao material transportado e podem ser lípidos catiónicos, polímeros catiónicos e nanopartículas inorgânicas (Coelho *et al.*, 2010,0; Patil *et al.*, 2005; Al-dosari *et al.*, 2009; Stryjewska *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2000). Os lípidos catiónicos são sintéticos e carregados positivamente, com uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. A parte hidrofílica, constituída por amins primárias, secundárias e terciárias é responsável pelo carácter positivo dos lípidos, permitindo que se estabeleçam interações eletrostáticas com o DNA terapêutico, protegendo-o das nucleases e favorecendo a sua interação com a membrana da célula-alvo. A carga negativa conferida pelos grupos fosfato vai levar à formação de lipoplexos e permite a interação com as glicoproteínas e proteoglicanos carregados negativamente da membrana celular da célula-alvo, facilitando a entrada do material genético por endocitose (Coelho *et al.*, 2010,0; Patil *et al.*, 2005; Al-dosari *et al.*, 2009; Stryjewska *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2007). Os polímeros catiónicos como a poli-L-Lisina e a polietilenimina permitem a compactação de genes de tamanho maior em poliplexos que melhoram a eficiência de transfeção e são mais estáveis (Smedt *et al.*, 2000). A sua carga positiva interage com as moléculas carregadas negativamente das células hospedeiras, permitindo a entrada do pDNA (Li *et al.*, 2000; Patil *et al.*, 2005). As nanopartículas inorgânicas utilizam metais como o ferro, o ouro e a prata que vão interagir com o DNA e, deste modo, este atravessa mais facilmente a membrana celular, bem como barreiras fisiológicas e celulares. É um método de baixa toxicidade e pouco afetado por respostas imunes (Al-dosari *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2010,0; Patil *et al.*, 2005; Stryjewska *et al.*, 2013).

1.3. DNA plasmídico

A primeira abordagem relativa à utilização do plasmídeo como uma ferramenta de clonagem de DNA aconteceu em 1973 por Stanley e colaboradores (Wang *et al.*, 2012). O pDNA é um vetor muito utilizado em terapias baseadas em DNA por ser seguro, estável, bem caracterizado, de fácil produção em larga escala e de baixa toxicidade e imunogenicidade. Os plasmídeos têm tamanho de um a 10,0 kilo pares de bases (kbp) (Diogo *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2008) e são produzidos com recurso a plataformas biotecnológicas, normalmente em *Escherichia coli* por replicação extracromossomal e devem ser constituídos pelos seguintes elementos essenciais:

- i) um promotor de expressão que permite a transcrição de um gene alvo;
- ii) um sinal de poliadenilação;
- iii) um marcador de seleção que lhe confira propriedades particulares, como a resistência a certos antibióticos (como a ampicilina e a estreptomicina) ou a metais pesados (como o mercúrio e o arsénio) e que permite a seleção da bactéria com o plasmídeo de interesse. É de referir que, para minimizar a resistência da flora microbiana endógena do paciente, a FDA não permite a inserção de marcadores de penicilina ou outros beta-lactâmicos no pDNA do vetor (Luke *et al.*, 2009);
- iv) uma origem de replicação, de modo a que tenha a capacidade de se replicar de uma forma autónoma, sem dependência do ciclo celular do hospedeiro;
- v) um sinal de múltipla clonagem no qual é inserido o gene de interesse;
- vi) um local de reconhecimento para uma endonuclease: onde as endonucleases irão cortar para permitir que o DNA seja inserido (se não tiver esse local, o plasmídeo não pode ser aberto para a inserção de novos genes e, se tiver dois ou mais, a endonuclease de restrição e a DNA ligase podem formar muitos produtos diferentes em vez de um só) (Sousa *et al.*, 2009; Gaspar *et al.*, 20015; Oliveira *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2010,0; Gaspar *et al.*, 2015; Gaspar *et al.*, 2014)

O DNA tem uma unidade responsável pela sua expressão no hospedeiro procariota e outra responsável pela expressão dos genes terapêuticos nas células eucarióticas (Sousa *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010,0; Oliveira *et al.*, 2013).

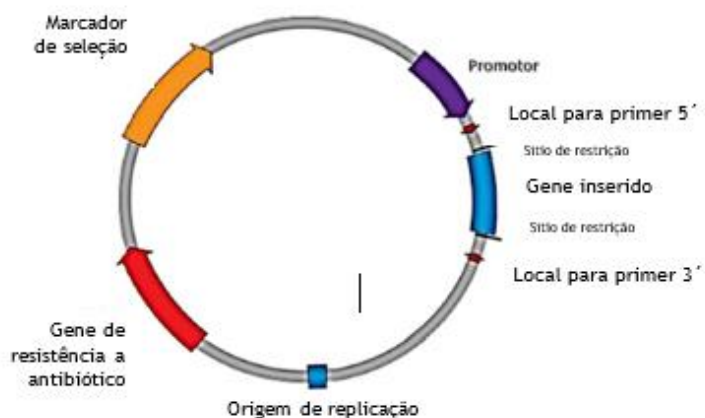


Figura 6: Esquematização de um plasmídeo (adaptado de Prazeres *et al.*, 2001).

O material genético está altamente compactado, o que leva a uma maior ocorrência da conformação superenrolada (Sousa *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2005; Dorman *et al.*, 2006; Urthaler *et al.*, 2005; Diogo *et al.*, 2005). Para além desta isoforma de pDNA, existem a circular aberta e a linear, que podem ser visíveis na electroforese em gel de agarose, representada na Figura 8. (Molloy *et al.*, 2004).

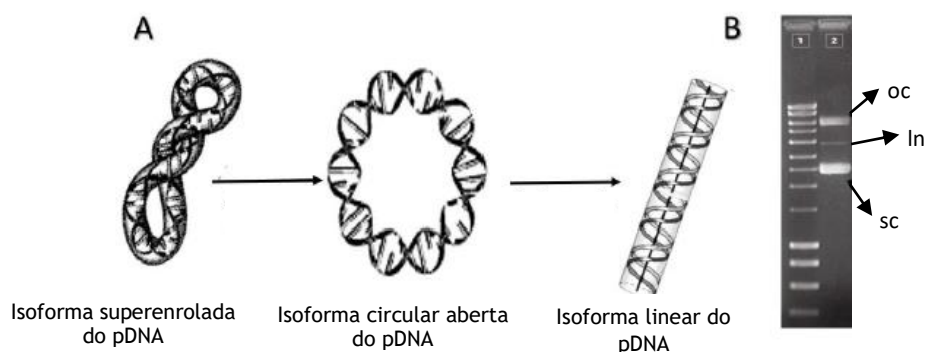


Figura 7: Topologias de plasmídeo: A - representação esquemática; B- DNA oc, ln e ac representados em electroforese em gel de agarose (adaptado de Molloy *et al.*, 2004).

Uma vez que as isoformas linear e circular aberta podem sofrer danos aleatoriamente em localizações importantes de genes, as agências reguladoras, consideram que a isoforma superenrolada é a mais eficiente (Schleef *et al.*, 2004) e, por esse motivo, a sua aplicação em contexto clínico implica uma pureza superior a 97%, a não presença de contaminantes, como as endotoxinas, DNA genómico, RNA e proteínas (Valente *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010,0; Oliveira *et al.*, 2013; Valente *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2009). O processo biotecnológico de produção do pDNA é dividido por dois passos: o *upstream* que engloba a produção do pDNA por organismos geneticamente modificados e o *downstream* que corresponde ao isolamento e purificação do plasmídeo (Sousa *et al.*, 2009).

1.3.1. Processo *upstream* - Construção e produção do plasmídeo

Os principais objetivos da fase *upstream* são uma correta seleção do plasmídeo e do microrganismo, bem como uma otimização das condições de crescimento de modo a que se produza um plasmídeo de DNA superenrolado puro, em elevadas quantidades e estável (Ferreira *et al.*, 2000), como representado na Figura 8.

A *Escherichia coli* é o hospedeiro mais utilizado por estar bem caracterizado geneticamente, por ter a capacidade de atingir num período de tempo relativamente curto uma elevada densidade celular (Hernández *et al.*, 2011), com um consumo reduzido de nutrientes, ser económico e por ter a possibilidade de ser modificada para replicar um elevado número de cópias de plasmídeo, melhorando o rendimento do processo de produção, e ser compatível com uma grande variedade de vetores disponíveis (Prather *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2012). As otimizações relacionadas com este hospedeiro incluem manipulações de temperatura, pH, concentração de determinada fonte de nutrientes, e o tipo de bioreator utilizado (Silva *et al.*, 2012).

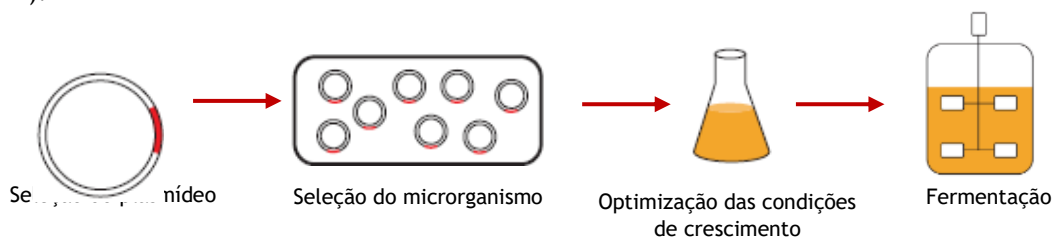


Figura 8: Representação esquemática das principais operações do passo *upstream* do processo de produção do sc DNA (Ferreira *et al.*, 2000).

1.3.2. Processo *Downstream* - Isolamento do plasmídeo

O primeiro passo do processo *downstream*, representado esquematicamente na Figura 9, é a lise celular que pode dar-se por métodos mecânicos, químicos e enzimáticos. A lise mecânica não é muito utilizada por ser agressiva para o DNA e a lise enzimática não é aceite pelas agências reguladoras devido aos efeitos adversos da administração de fármacos com resíduos de RNases (Stadler *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2000). O método químico mais utilizado consiste na lise alcalina (Sousa *et al.*, 2012) com hidróxido de sódio (NaOH) (Birnboim *et al.*, 1979) que enfraquece a membrana celular permitindo a libertação das biomoléculas produzidas intracelularmente (Prather *et al.*, 2003; Diogo *et al.*, 2005). Em seguida, é realizada a precipitação com isopropanol, seguida de passos de concentração e clarificação que permitem a redução de algumas impurezas como as proteínas de baixo peso molecular e ácidos nucleicos (Prazeres *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2000).

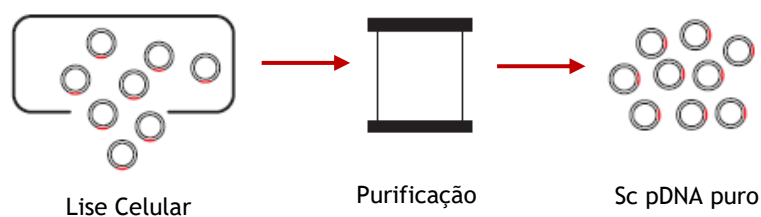


Figura 9: Representação esquemática das principais operações do passo *downstream* do processo de produção do sc DNA (Ferreira *et al.*, 2000).

O processo *downstream* é extremamente importante para que se cumpram os pré-requisitos impostos pelas agências reguladoras como a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Evaluation Agency* (EMA) (Hernández *et al.*, 2005) que estipulam a percentagem máxima de biomoléculas específicas admissível de modo a que o DNA terapêutico possa ser aplicado biologicamente (Sousa *et al.*, 2010,0). Este passo é fortemente dependente do processo *upstream*, uma vez que a possível presença de impurezas e contaminantes vai afetar a eficiência dos passos de purificação (Ferreira *et al.*, 2000). Na tabela 1 podem observar-se algumas das condições que devem ser garantidas na purificação do pDNA.

Tabela 1: Condições estabelecidas pelas agências reguladoras relativamente à presença de contaminantes de plasmídeo resultantes da plataforma biotecnológica recombinante (adaptado de Stadler *et al.*, 2004; Llinman *et al.*, 2010,0).

Lisado de <i>E. coli</i>		pDNA Purificado	
Componentes	Conteúdo (%)	Quantidade Regulamentada	Método de Quantificação
Proteínas	15%	< 3 µg/mg pDNA	Teste BCA
RNA	21%	< 0,2 µg/mg pDNA	HPLC Analítico
gDNA	3%	< 2 µg/mg pDNA	TaqMan-PCR
Endotoxinas	3%	< 0,010,0 EU/µg	Teste LAL
pDNA	< 3%	>97% sc pDNA	HPLC Analítico
Outras	15%	-	-

A maior dificuldade para a purificação do pDNA prende-se com o facto de que o sc pDNA e outras isoformas e impurezas partilham muitas características, nomeadamente a carga negativa (partilhada por RNA, gDNA e endotoxinas e pela isoforma superenrolada do pDNA), tamanho idêntico (gDNA, endotoxinas e oc pDNA) e hidrofobicidade semelhante (endotoxinas) (Stuve *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2010,0; Sousa *et al.*, 2012). A remoção das endotoxinas como contaminantes é fundamental uma vez que podem produzir sintomas de choque tóxico *in vivo* e reduzir a eficiência de transfeção em estudos *in vitro* (Diogo *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2010,0).

A cromatografia (Figura 10,0) é considerado o método de eleição para a purificação do pDNA (Sousa *et al.*, 2009; Urthaler *et al.*, 2005) por ser um método rápido, simples, económico e reprodutível (Urthaler *et al.*, 2005). Além disso, permite um controlo das condições como o tamanho, propriedades químicas, carga, hidrofobicidade, acessibilidade das bases nucleotídicas para os ligandos e as restrições e afinidade impostas pela isoforma superenrolada (Sousa *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2008), que permitem a diferenciação da biomolécula de interesse das restantes, conferindo-lhe maior afinidade para a fase móvel ou para uma estacionária, de modo a que possa ser isolada.

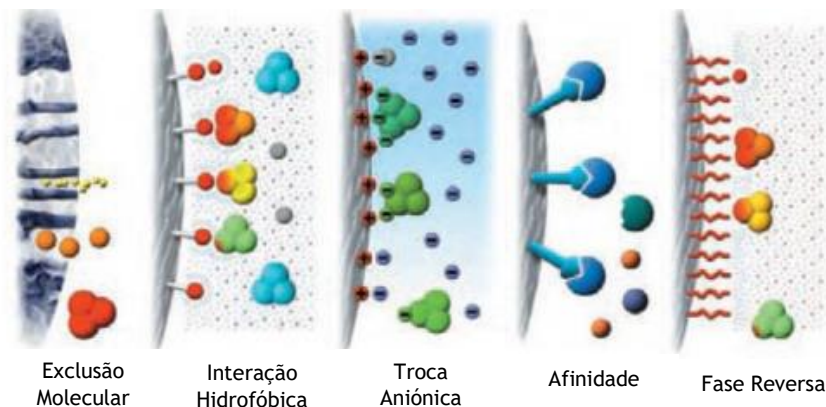


Figura 10,0: Esquematização dos diversos tipos de cromatografia (adaptada de Healthcare, 2010,0).

1.3.2.1. Processos cromatográficos

A cromatografia de exclusão molecular baseia-se na diferença de tamanho existente entre as diversas moléculas do lisado. Uma das vantagens deste processo advém do facto de que partículas de maior peso molecular como o gDNA e o pDNA eluem mais rápido, ao passo que as de menor peso como o RNA, proteínas e endotoxinas têm um tempo de retenção superior dado que ficam retidas no interior dos poros da matriz (Sousa *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2000). Esta técnica é considerada pouco seletiva dada a semelhança entre as diversas isoformas do pDNA relativamente ao gDNA, podendo contudo ser aplicada conjuntamente com outros métodos de purificação (Ghanem *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2010,0), nomeadamente como um passo de polimento, permitindo a remoção de contaminantes residuais (Ferreira, 2005; Sousa *et al.*, 2008; Ghanem *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2009; Ferreira, 2005; Li *et al.*, 2007).

A cromatografia de troca aniónica permite a separação das diversas biomoléculas baseando-se nas diferenças de carga entre as moléculas e a fase estacionária (Diogo *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2008) e pode ser aplicada quer a uma escala preparativa, quer analítica (Stadler *et al.*, 2004). Os ligandos utilizados no suporte sólido são amins quaternárias, e as interações que se estabelecem são maioritariamente eletrostáticas (Sousa *et al.*, 2008). Os ácidos nucleicos, de carga negativa, interagem com os grupos funcionais carregados positivamente da matriz provocando diferentes tempos de retenção das isoformas à medida

que aumenta o gradiente de sal (Ghanem *et al.*, 2013) e as moléculas eluem por ordem crescente de carga (Sousa *et al.*, 2008). Esta técnica cromatográfica tem-se mostrado eficiente na separação da isoforma sc de pDNA, que tem uma densidade de carga maior do que a isoforma oc (Sousa *et al.*, 2008). No entanto, muitas fases estacionárias exibem fraca seletividade de separação entre o pDNA e as impurezas devido às afinidades de ligação serem semelhantes (Diogo *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2009; Ghanem *et al.*, 2013; Prazeres *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2000; Stadler, *et al.*, 2004).

A cromatografia de fase reversa é baseada nas interações hidrofóbicas entre o soluto e a fase estacionária apolar, sendo que a eluição dos solutos ocorre por diminuição da ordem de polaridade (Stadler *et al.*, 2004). Este método implica uma fase estacionária hidrofóbica e uma fase móvel de eluente hidrorgânico (Diogo *et al.*, 2005) e constitui um método eficiente na remoção de endotoxinas (Stadler *et al.*, 2004).

A cromatografia de interação hidrofóbica baseia-se na utilização de ligandos hidrofóbicos que estabelecem interação com as regiões não polares das biomoléculas do lisado (Sousa *et al.*, 2008) devido às diferenças de hidrofobicidade entre o pDNA, ácidos nucleicos de cadeia simples e endotoxinas (Diogo *et al.*, 2005). Neste método, a retenção ocorre a elevadas concentrações de sal, de modo a que seja promovida a remoção das moléculas de água à volta dos grupos hidrofóbicos e seja possível a ligação das biomoléculas aos ligandos (Sousa *et al.*, 2008). A eluição é promovida pela diminuição da concentração de sal que enfraquece as ligações hidrofóbicas. A necessidade de utilização de elevadas concentrações de sal é vista como uma desvantagem visto que está associada a altos custos e a um impacto ambiental negativo (Sousa *et al.*, 2008; Ghanem *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2009; Diogo *et al.*, 2005).

1.3.2.2. Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade permite a purificação das biomoléculas com base na sua função biológica e estrutura química (Ghanem *et al.*, 2013) motivo pelo qual se tornou no método de separação de eleição para as áreas da farmacêutica e biotecnologia (Hage, 1999). A cromatografia de afinidade separa as biomoléculas de acordo com as interações reversíveis entre a biomolécula alvo e o seu ligando específico, que é acoplado à matriz cromatográfica (Sousa *et al.*, 2008). A escolha da matriz e das condições usadas depende das propriedades físico-químicas das biomoléculas e do tipo de interações moleculares (Sousa *et al.*, 2008). Os ligandos utilizados neste processo podem ser naturais ou sintéticos, no entanto, na literatura tem sido descrita preferência pelos sintéticos uma vez que combinam a seletividade dos ligandos naturais com a eficácia e durabilidade dos sistemas sintéticos (Hage, 1999). Assim sendo, pode afirmar-se que a escolha do ligando é essencial para o alcance de uma boa estratégia de purificação uma vez que estes vão ditar o tipo de interações que vão ocorrer, podendo estas ser, eletrostáticas, hidrofóbicas, forças de Van der Waal's e pontes de hidrogénio

(Sousa *et al.*, 2008). A eluição das diversas biomoléculas envolvidas pode ser promovida especificamente, utilizando ligandos competitivos, ou de um modo não específico, através da manipulação de condições como o pH, a temperatura, polaridade e a força iônica e das características químicas das biomoléculas (Sousa *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2000).

Estão descritas uma diversidade de técnicas relativas à temática abordada, nomeadamente, a cromatografia de afinidade de íons metálicos imobilizados (IMAC), cromatografia de afinidade de tripla-hélice, cromatografia de afinidade proteínas-DNA, cromatografia de afinidade com aminoácidos e cromatografia de afinidade polimixina B (Li *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2012; Pfaunmiller *et al.*, 2013) representadas na tabela 2.

Tabela 2: Métodos cromatográficos de afinidade para purificação de pDNA (adaptado de Sousa *et al.*, 2008).

Tipo de Afinidade	Princípio	Especificidade	Vantagens	Limitações
Por metal imobilizado	Agentes quelantes carregados com íons metálicos divalentes que interagem especificamente com átomos de azoto aromático através de ligações π - π ;	Ácidos nucleicos de cadeia simples (particularmente as bases de purina);	Separação eficiente do RNA do gDNA e pDNA, bem como eficiente remoção de endotoxinas; Separação do pDNA desnaturado;	Em misturas complexas a separação do RNA não é eficiente; Co-eluição das isoformas do DNA;
Tripla hélice	Sequências específicas presentes no pDNA reconhecidas por um oligonucleótido que forma uma tripla hélice;	DNA de cadeia dupla;	Discriminação de diferentes plasmídeos baseada nas suas sequências; isolamento de sc pDNA apenas num passo cromatográfico; Redução do RNA gDNA, e endotoxinas; Possibilidade de <i>scale up</i> ;	Perda de pDNA durante os passos de lavagem; baixo rendimento; cinética baixa de formação de tripla hélice; tempos de corrida elevados;
Polimixina B	A polimixina imobilizada reconhece especificamente a estrutura lipídica das endotoxinas;	Endotoxinas;	Eliminação das endotoxinas contaminantes do DNA	Interação não específica dos ligandos com o pDNA; Baixo rendimento; toxicidade da polimixina B.
Proteína-DNA	A proteína imobilizada na matriz reconhece especificamente o DNA;	pDNA;	Discriminação de diferentes plasmídeos baseada na sua sequência; isolamento de pDNA de lisados clarificados; Eliminação de proteínas e RNA;	Baixo rendimento; Contaminação com gDNA;
Aminoácido-DNA	Interações múltiplas ocorrem entre os aminoácidos imobilizados e os ácidos nucleicos;	sc pDNA;	Purificação de sc pDNA num único passo cromatográfico; Eliminação eficiente de RNA, gDNA, proteínas e endotoxinas;	Eluição com altas concentrações de sal;

A escolha do ligando apropriado é uma parte essencial na cromatografia de afinidade, pois é o que determina a especificidade e estabilidade dos sistemas de purificação (Caramelo-Nunes *et al.*, 2013).

A utilização de aminoácidos como ligandos para a purificação de pDNA é um conceito promissor (Ghanem *et al.*, 2013), cuja segurança é comprovada pela existência de complexos proteína-DNA nos sistemas biológicos. Os aminoácidos mais utilizados são a histidina (Sousa *et al.*, 2005), a arginina (Sousa *et al.*, 2009), a lisina, a metionina e a tirosina. As matrizes de arginina-agarose foram utilizadas como estratégia de cromatografia de afinidade para a purificação do pDNA pVAX1-LacZ com uma pureza de 99% (Sousa *et al.*, 2009). Matrizes de histidina-agarose mostraram igualmente ser eficientes na purificação do pDNA pVAX1-LacZ com pureza de 10,00%, embora com baixo rendimento (Sousa *et al.*, 2013). No entanto estas matrizes apresentam algumas limitações como a necessidade de trabalharem a baixas taxas de fluxo e terem elevadas taxas de retenção que podem motivar a degradação do pDNA (Sousa *et al.*, 2011). A utilização da agmatina, obtida por uma descarboxilação da arginina, revelou também resultados muito promissores no isolamento do sc pDNA (Sousa *et al.*, 2014). Apesar da cromatografia de afinidade ser capaz de purificar, eliminar passos adicionais, aumentar rendimentos e melhorar processos de forma a serem mais económicos, apresenta limitações particularmente no que diz respeito à origem do ligando e baixa capacidade de ligação (Ghanem *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2008).

A utilização de ligandos de afinidade com anéis aromáticos na sua estrutura é relativamente comum na purificação cromatográfica de proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos em cromatografia de afinidade sendo por isso utilizados neste trabalho. Para se encaixar nesta categoria, um composto deve ser bicíclico, ter uma orbital p em cada átomo do anel, ter uma estrutura planar e incluir um loop fechado de $(4n+2)$ eletrões (sendo n um número inteiro). Os compostos aromáticos têm elevadas energias de ressonância e são mais estáveis que as moléculas insaturadas. Existem diversos estudos de ligandos de origem aromática usados como intercaladores, na purificação de pDNA como por exemplo, o derivado de fenantridina, 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP), recentemente utilizado na separação e purificação de pDNA (Caramelo-Nunes *et al.*, 2014).

A cromatografia de pseudo-afinidade é uma abordagem cromatográfica eficiente, tanto a nível preparativo como analítico e difere da cromatografia de afinidade, na utilização de ligandos não biológicos, como corantes e metais. (Li *et al.*, 2009), fornecendo uma vasta variedade de ligandos de baixo custo, estáveis e de fácil obtenção para processos de imobilização e posterior purificação (Li *et al.*, 2009). De um modo geral pode afirmar-se que esta estratégia de purificação é uma boa escolha para o isolamento de um sc pDNA de qualidade, dentro dos padrões estipulados pelas agências reguladoras.

1.3.2.2.1. Ácido barbitúrico e barbituratos

Não obstante, e tanto quanto é do nosso conhecimento, o ácido barbitúrico e barbituratos nunca terem sido usados como ligandos em cromatografia de afinidade, o seu carácter aromático e pirimidínico e riqueza estrutural potenciam a interação não apenas de ligações π - π , mas também o seu carácter hidrofóbico, hidrofílico, pontes de hidrogénio e ligações iónicas potenciando a sua utilização.

O ácido barbitúrico foi sintetizado pela primeira vez em 1863, pelo investigador alemão Adolf Von Baeyer. Desde essa altura que foram e têm sido investigados mais de 2500 derivados do ácido (Fernández *et al.*, 2000; Willow *et al.*, 1983). Esta substância é chamada de "malonilureia ou hidropirimidina" e resulta da reação entre o ácido malónico e a ureia de onde se podem derivar substâncias com aplicação terapêutica. É um grupo de substâncias depressoras do Sistema nervoso central, aplicadas como antiepilépticos, sedativos e hipnóticos (Willow *et al.*, 1983). O ácido barbitúrico e seus derivados são considerados hidrofílicos devido ao seu sistema em anel 2,4,6-pirimidinetriona, e lipofílicos devido à natureza dos substituintes 5,5'. O ácido barbitúrico é um ácido forte, com um pKa de 4,01 em água. É parcialmente solúvel em solventes polares como o metanol e a água, nos quais mantém as suas propriedades acídicas (devido ao NH não substituído) e é convertido no sal correspondente quando tratado com uma base (Neumann, 2000). O anel do ácido barbitúrico tem um carbono hibridizado sp^3 e é tratado como um sistema aromático aquiral, a menos que os substituintes 5,5 sejam diferentes um do outro (Neumann, 2000).

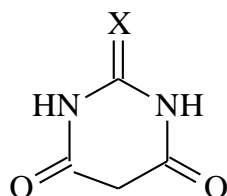


Figura 11: (X=O,S) Ácido barbitúrico (X=O), Ácido Tiobarbitúrico (X=S).

Substituições C-2 ou C-5 do ácido barbitúrico (Figura 11, X=O) permitem a síntese de derivados com atividades variadas. Substituições em C-5 resultam na produção do amobarbital, pentobarbital, secobarbital e hexobarbital. Substituições em C-2 resultam na produção de tiopental e tiamilal, fármacos de curta duração (Figura 12).

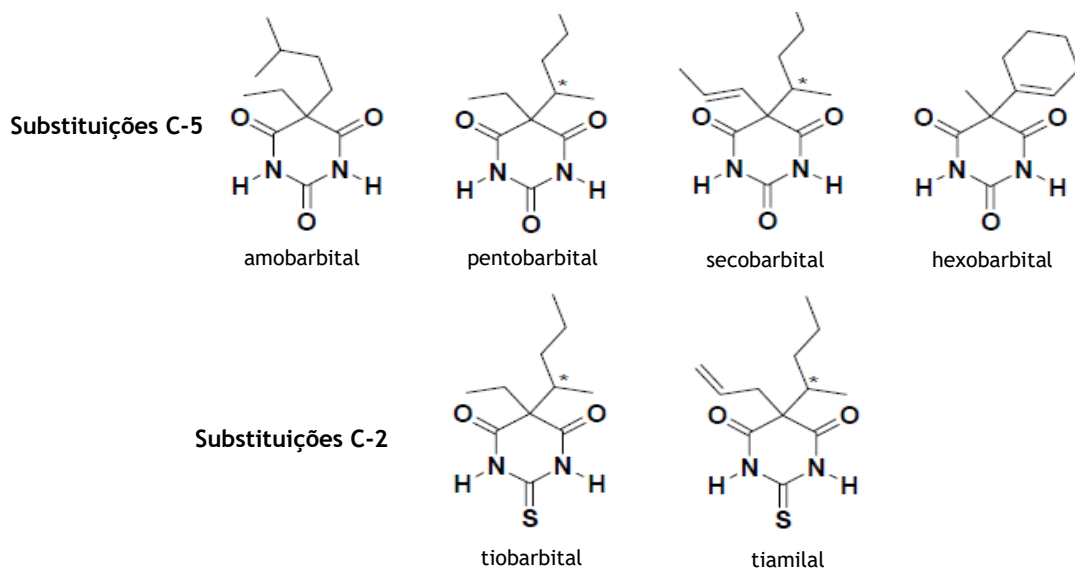


Figura 12: Substituições C-2 e C-5 do ácido barbitúrico (adaptado de Newmann *et al.*, 2000).

A partir de 1903 começou a comercializar-se o barbital (o primeiro barbitúrico hipno-indutor), com o nome comercial de Veronal; em 1912 surgiu o fenobarbital com o nome comercial de Luminal, com uma acção mais prolongada (Willow *et al.*, 1983). Este fármaco teve ampla aceitação clínica, sendo utilizado actualmente como um anti-convulsivo eficaz (Willow *et al.*, 1983, Raafat *et al.*, 2011; Mehier, 2011). Os barbituratos são depressores derivados do barbital. Podem ser organizados em três categorias, fármacos de longa duração (8 a 16 horas) para tratamento de epilepsia, e pressão sanguínea alta, como o Veronal e o Luminal, os fármacos de duração média (4 a 6 horas) para controlo de distúrbios de sono, como o amobarbital, e os fármacos de curta duração utilizados como anestésicos ou sedativos, como o pentobarbital e o secobarbital (Ross *et al.*, 1972).

Estas substâncias ultrapassam facilmente a barreira hematoencefálica e afectam o receptor do neurotransmissor GABA, induzindo a inibição da atividade do sistema nervoso central e reduzindo, conseqüentemente, as funções de alguns sistemas orgânicos (Takehiko *et al.*, 1996). Os barbituratos, de maneira semelhante aos benzodiazepínicos, e juntamente com os opiáceos, foram durante bastante tempo as substâncias usadas para tranquilizar a agitação e ansiedade de doentes com problemas psiquiátricos (Willow *et al.*, 1983). Este facto contribuiu para o alargamento da sua utilização clínica e, conseqüentemente, para o seu consumo abusivo, que se veio a tornar num problema clínico grave (Willow *et al.*, 1983). Os barbituratos provocam dependência física e psicológica, diminuição em várias áreas do cérebro, depressão na respiração e no sistema nervoso central, depressão na medula, depressão do centro do hipotálamo, vertigem, espasmo da laringe, sedação e alteração motora, motivo pelo qual podem causar morte por depressão respiratória e cardiovascular se forem administrados em excesso (Henn *et al.*, 2007). Desde 1956, a Organização Mundial de Saúde fez vários alertas para as conseqüências do abuso de barbituratos, mas apenas em 1971, com a Convenção de

Viena se iniciou o controlo dos mesmos (Willow *et al.*, 1983). Estes fármacos passaram a ser comercializados apenas com receita médica para, progressivamente, serem retirados da composição de vários medicamentos (Willow *et al.*, 1983). Em Portugal, o crescimento exponencial da sua utilização é agravado pelo facto do consumo de barbituratos ser frequentemente associado ao de benzodiazepinas (Garrett *et al.*, 1971; Parker *et al.*, 2004).

Os derivados do ácido tiobarbitúrico (Figura 11, X=S) são anestésicos mais poderosos que os derivados de ácido barbitúrico devido à sua mais eficiente solubilidade lipídica e ao facto de serem melhores aceitadores de hidrogénios. O Ácido tiobarbitúrico tem também energias de ionização mais baixas e, conseqüentemente, melhor capacidade de doar eletrões que o ácido barbitúrico (Ng *et al.*, 2008) (Guillén-Sans *et al.*, 1998).

O ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico (Figura 13) é um derivado do ácido tiobarbitúrico sintetizado em dois passos: o primeiro que faz reagir fenilisotiocianato com anilina, com a adição de diclorometano e trietilamina para produzir 1,3 difeniltiourea e o segundo que parte da 1,3 difeniltiourea e de ácido malónico em cloreto de acetilo para produzir o ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico.

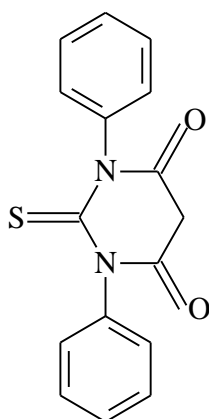


Figura 13: Ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico

Embora não estando descritos estudos de bioseparação através de cromatografia de afinidade, utilizando barbituratos como ligandos, no trabalho aqui descrito foram conseguidos resultados que potenciam o seu uso como ligandos de afinidade, nomeadamente na purificação de plasmídeo, especificamente na separação e purificação das vacinas de pDNA do vírus influenza, por cromatografia de afinidade.

1.3.2.2.2. Matrizes cromatográficas para a purificação de vacinas de pDNA

Ao escolher um suporte cromatográfico, a natureza da fase móvel deve estar adaptada, não apenas à fase estacionária mas também às características e estabilidade da molécula alvo, neste caso, o pDNA. A fase estacionária ideal deve ser sólida, macroporosa, química e fisicamente estável, exibir adsorção inespecífica com alta capacidade de ligação e transferência de massa e ter boas propriedades de fluxo (Billen e Desmet, 2007). As matrizes cromatográficas, representados na Figura 14, podem ser agrupadas em partículas porosas, não porosas e superporosas e matrizes com camadas porosas enquanto as matrizes contínuas são representadas por membranas, criogéis e monólitos.

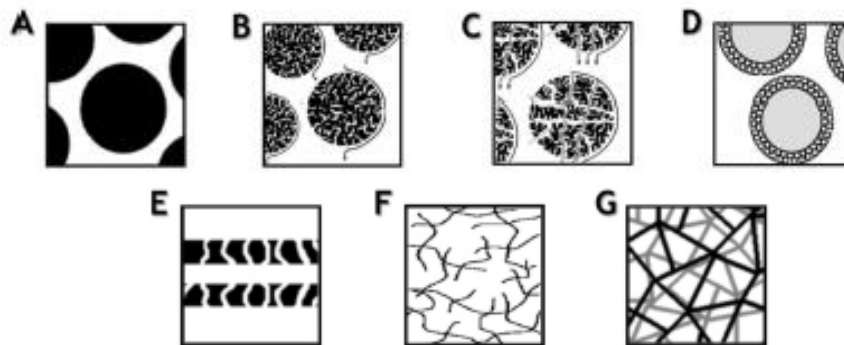


Figura 14: Representação estrutural dos diferentes suportes cromatográficos (A) Partículas não porosas (difusão); (B) Partículas porosas (difusão); (C) Partículas superporosas (perfusão); (D) Partículas com camadas porosas; (E) membranas; (F) criogéis; (G) monólitos (adaptado de Sousa *et al.*, 2012; Billen *et al.*, 2007)

Tabela 3: Tipos de matrizes cromatográficas e suas características principais (adaptado de Billen *et al.*, 2007)

Matriz cromatográfica	Características	Referências
Partículas		
Não porosas (difusão) (A)	Especialmente útil para controlo de qualidade, monitorização e avaliação da pureza de biomoléculas. A falta de poros elimina a resistência à transferência de massa e o efeito de difusão intraparticular; Rápida separação e análise eficiente; Altas pressões;	(Lee, <i>et al.</i> , 1997; Gustavsson <i>et al.</i> , 2004)
Porosas (difusão) (B)	Criada para ultrapassar as limitações das partículas não porosas; aumenta a área superficial de contacto das biomoléculas. Poros pequenos estagnam a fase móvel e as moléculas entram apenas por difusão molecular aumentando a resistência à transferência de massa; Forças de corte podem causar perda irreversível da atividade biológica do pDNA;	(Freitas <i>et al.</i> , 2007; Gustavsson <i>et al.</i> , 2004)
Superporosas (perfusão) (C)	Rede de poros interconectados que permite o transporte de massa intraparticular por convecção molecular; boas propriedades de resistência à transferência de massa; Melhoramento do fator de purificação e concentração do produto desejado, a velocidade de fluxo é cerca de cinco vezes maior, comparativamente às partículas não porosas; O número de poros não é suficiente para ultrapassar as limitações de difusão;	(Faman <i>et al.</i> , 2002; Gustavsson <i>et al.</i> , 1999)
Camadas porosas (D)	Partículas pequenas altamente porosas; Baixas pressões; Especialmente usadas para a separação de proteínas ou identificação de gás no campo analítico;	(Billen e Desmet, 2007)
Contínua		
Membranas (E)	Poros largos com diâmetro similar e otimizado; Usados para filtração e concentração e como uma alternativa para a cromatografia de polimento; Adsorvedores de membrana aumentam a resolução cromatográfica, a eficiência e a produtividade; Custos elevados e baixo rendimento devido às baixas áreas superficiais;	(Przybycien <i>et al.</i> , 2004; Haber <i>et al.</i> , 2004)
Criogéis (F)	Produzido pela polimerização de materiais específicos, combina as vantagens das propriedades de transferência de massa e permeabilidade dos suportes rígidos; Capacidade de purificar soluções não clarificadas bem como suspensões celulares mais complexas para extrair a molécula alvo;	(Noppe <i>et al.</i> , 2007)
Monólitos (G)	Matrizes rígidas altamente porosas com alta capacidade de ligação; Excelentes propriedades de transferência de massa; pouco tempo de contacto com as biomoléculas o que reduz a degradação de biomoléculas; Excelente solução para purificação de pDNA devido ao grande número de pontos de ligação.	(Dankuah e Forde, 2008)

1.4. Criogéis

Os suportes cromatográficos convencionais particulados apresentam algumas limitações como baixas taxas de fluxo, altas pressões, baixa reprodutibilidade, dificuldade de “*scale-up*” e poros pequenos (Ma *et al.*, 2008; Uygun *et al.*, 2013). Por este motivo não são os mais indicados para a separação de biomoléculas de tamanhos maiores como os ácidos nucleicos, devido ao seu elevado peso molecular, viscosidade e baixo coeficiente de difusão (Prazeres, 1998; Diogo *et al.*, 2005).

A constante procura por moléculas biológicas altamente puras desencadeou o desenvolvimento de novos materiais poliméricos para serem aplicados em bioseparação. Os materiais poliméricos macroporosos têm sido muito utilizados em áreas como a biotecnologia porque permitem o isolamento e purificação de várias biomoléculas como os ácidos nucleicos (Ertürk *et al.*, 2014).

Na tentativa de ultrapassar estas limitações desenvolveram-se novos suportes cromatográficos, com aplicação em biotecnologia farmacêutica, baseados na utilização de criogéis como fases estacionárias (Uygun *et al.*, 2013; Lozinsky *et al.*, 2003) que permitem melhorar a difusão, aumentar a capacidade de ligação do suporte à molécula alvo (Perçin *et al.*, 2011) têm altas taxas de fluxo e baixas pressões devido aos seus macroporos (Lozinsky, *et al.*, 2003; Arvidsson *et al.*, 2003; Lozinsky *et al.*, 2002; Arvidsson *et al.*, 2002; Babac *et al.*, 2006; Dainiak *et al.*, 2006; Hanora *et al.*, 2006; Demiryas *et al.*, 2007).

Os criogéis (Lozinsky *et al.*, 2003) são sistemas de géis formados em condições criogénicas (congelamento - polimerização no estado congelado - descongelamento) de soluções ou dispersões coloidais de precursores específicos (Lozinsky, 2002; Ertürk *et al.*, 2014; Lozinsky *et al.*, 2003). Os criogéis, utilizados pela primeira vez há 40 anos (Lozinsky *et al.*, 2003), são materiais poliméricos esponjosos, altamente porosos e elásticos, de elevada força mecânica, estabilidade e com interações não-específicas minimizadas devido à natureza hidrofílica dos polímeros constituintes. Formam-se a temperaturas abaixo do ponto de fusão do solvente evitando problemas de citotoxicidade (Lozinsky *et al.*, 2003).

Os criogéis são matrizes superporosas de hidrogéis preparados em condições criogénicas, formados pela reação entre precursores monoméricos ou polímeros nos quais os cristais de gelo atuam como moldes para a formação de poros, conferindo-lhes determinado tamanho e forma que permanecem após o seu descongelamento (Lozinsky *et al.*, 2003; Sahiner *et al.*, 2014; Ertürk *et al.*, 2014). A forma e tamanho dos cristais de gelo determina a forma e tamanho dos cristais formados (Sahoo *et al.*, 2011; Nabati *et al.*, 2011; Chellapandian *et al.*, 1998; Yilmaz *et al.*, 2009). As interconecções para formação dos géis são formadas em regiões onde se encontram as interrupções físicas, ou unidades formadoras de poros. Têm sido utilizados diferentes materiais como unidades formadoras de poros, como o sal (Huang *et al.*, 2007), o açúcar (Wei *et al.*, 2009), bactérias vivas (Xu *et al.*, 2005), sílica (Stachowiak *et al.*, 2005) e

esferas de gelatina (Draghi *et al.*, 2005). O problema associado a estes métodos é a remoção das unidades formadoras de poros e, também, o nível de conectividade inadequado que se atinge. Dependendo da composição química da unidade formadora de poros, o solvente utilizado para a remover pode permanecer no gel e requerer uma lavagem extensiva para prevenir problemas de citotoxicidade, o que pode consumir bastante tempo, gerando desperdício e sendo uma oportunidade de contaminação (Ertürk *et al.*, 2014). A criocongelação é então um método simples que forma uma matriz de poros bem interconectados na qual a remoção das unidades formadoras de poros acontece pelo simples descongelamento do criogel a temperaturas acima do ponto de fusão do solvente, evitando a utilização de solventes para este fim.

As propriedades do criogel, em particular o tamanho do poro, são influenciadas pelo tipo e grau de ligações, pela composição da solução de gel, pela temperatura, pelo tempo e taxa de criocongelação. A temperaturas mais baixas o solvente cristaliza mais rapidamente, resultando na nucleação de um grande número de cristais de solvente pequenos (Lozinsky *et al.*, 1986), o que influencia também o tamanho dos poros (Lozinsky *et al.*, 2001; Dinu *et al.*, 2007).

Os criogéis podem ser formados por polimerização utilizando uma vasta gama de polímeros naturais e sintéticos, monómeros ou oligómeros. O tamanho final dos poros do criogel é também influenciado pela percentagem e peso molecular de polímero usado. Os criogéis formados a partir de polímeros de mais elevado peso molecular resultam na formação de poros mais pequenos (devido ao relativamente baixo volume de água livre em solução que pode ser cristalizada), quando comparados com soluções de géis de polímeros de baixo peso molecular (Henderson *et al.*, 2013; Ivanov *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2009; Van-Vlierberghe *et al.*, 2009). A crioconcentração dos constituintes reacionais na microfase líquida acelera o processo de gelação e diminui a concentração crítica necessária para o processo de criocongelação, o que permite a formação de soluções de baixo teor de monómero (Lozinsky *et al.*, 2001). A taxa de arrefecimento também influencia o processo de criocongelação, sendo que uma taxa de arrefecimento mais lenta propicia uma melhor formação e crescimento de cristais de gelo que vão formar os poros do criogel (Hwang *et al.*, 2010,0; Ozmen *et al.*, 2007; Kathuria *et al.*, 2009; Gang *et al.*, 2004; He *et al.*, 2007). Devido à elasticidade da parede do poro, os criogéis têm uma grande capacidade de rehidratação sem que isso afecte a estrutura dos poros: quando expostos a soluções aquosas a sua rehidratação acontece em poucos segundos. A capacidade de reidratação (“Swelling degree”) muda consoante o tipo de composição do polímero e é caracterizada pelo estudo do peso do criogel quando este é comprimido retirando o excesso de água, comparando-o com o peso do criogel molhado, através da seguinte equação (1) (Ertürk e Mattiasson, 2007; Henderson *et al.*, 2013):

$$\text{"Swelling degree"} \approx \frac{(m \text{ criogel molhado} - m \text{ criogel seco})}{(m \text{ criogel molhado})} \quad (1)$$

Como o solvente está capilarmente ligado, a sua compressão mecânica remove uma grande parte do solvente sem causar dano à estrutura do gel, o que não acontece com os outros hidrogéis não-macroporosos (Savina *et al.*, 2009). Por este motivo os criogéis podem ser armazenados por longos períodos de tempo sem que isso altere as suas propriedades e o seu desempenho (Rauf *et al.*, 2008; Uygun *et al.*, 2009).

O tamanho dos macroporos nos criogéis pode variar entre 10,0 e 10,00 μm (Lozinsky *et al.*, 2003). Os criogéis com poros mais pequenos e estreitos apresentam maiores áreas de superfície, o que permite maior ligação de biomoléculas-alvo (Berthelot *et al.*, 1859; Zhu *et al.*, 2005; Uygun *et al.*, 2012). A estrutura única dos criogéis, em combinação com a sua estabilidade osmótica e as propriedades de estabilidade química e mecânica, torna-os matrizes promissoras para processos cromatográficos de separação, não só de biomoléculas mas também de nanopartículas, plasmídeos, vírus e organelos celulares, e de células inteiras (Lozinsky *et al.*, 2003). Os criogéis são, além disso, materiais baratos e que podem ser facilmente eliminados (Berele *et al.*, 2010,0).

Estes polímeros podem ser usados sob a forma de monólitos, bem como na forma de membranas, combinando as vantagens da cromatografia de membrana em termos de altas taxas de fluxo e elevada reprodutibilidade (Berele *et al.*, 2010,0; Lozinsky *et al.*, 2002).

Para a caracterização dos poros dos criogéis (tamanho, forma e distribuição) são utilizadas técnicas como a microscopia electrónica de varrimento (SEM).

1.4.1. Preparação de criogéis

Assim como a natureza química das ligações é determinada pela estrutura química do polímero, a morfologia do gel é determinada pelo processo de preparação do gel (Lozinsky *et al.*, 2003). A técnica utilizada para a produção de criogéis é a criocongelação ou congelação criotópica, cujo estudo teve início em 1970 (Ertürk *et al.*, 2014).

Os criogéis são geralmente preparados a temperaturas entre os -5 a -20°C: temperatura a que grande parte do solvente cristaliza e outra parte se mantém na forma líquida (Henderson *et al.*, 2013), nas quais os precursores do gel (monómeros, agente reticulante, iniciadores e solvente) são congelados (Lozinsky, 2002; Ertürk *et al.*, 2014). Esta temperatura criogénica é responsável por definir o tamanho e quantidade de poros que se irão formar no criogel (Henderson *et al.*, 2013). Se o processo de criocongelação for conduzido a temperaturas mais baixas, entre os -10,0 e os -20°C, o solvente cristaliza de forma mais rápida, o que resulta na nucleação de um maior número de cristais e, conseqüentemente, um maior número de poros formados, embora de menor tamanho (Henderson *et al.*, 2013).

A principal função da criocongelção é a cristalização do solvente, o que distingue este processo de processos de arrefecimento e subsequente indução de congelamento, onde este acontece após um decréscimo da temperatura, não passando assim o solvente por fases de transição até ao congelamento (Lozinsky, 2002).

Na preparação dos criogéis podem ser usados vários tipos de monómeros ou precursores poliméricos com grupos reativos específicos, bastando para isso escolher os reagentes apropriados. A superfície do criogel pode também ser modificada quimicamente pelo acoplamento de diferentes ligandos. O processo de congelação criotópico produz materiais poliméricos com diferenças morfológicas, quando comparado com sistemas de matrizes poliméricas que não foram sujeitos a temperaturas de congelamento (Lozinsky, 2002; Lozinsky *et al.*, 2003). O congelamento criotrópico é um tipo específico de polimerização que resulta num tratamento criogénico capaz de formar géis (Lozinsky *et al.*, 2002; Lozinsky, 2008).

O processo de preparação de criogéis por crio-congelção está representado na Figura 15 e engloba três etapas: a preparação da solução com os precursores do criogel, o congelamento da solução e o descongelamento do criogel.

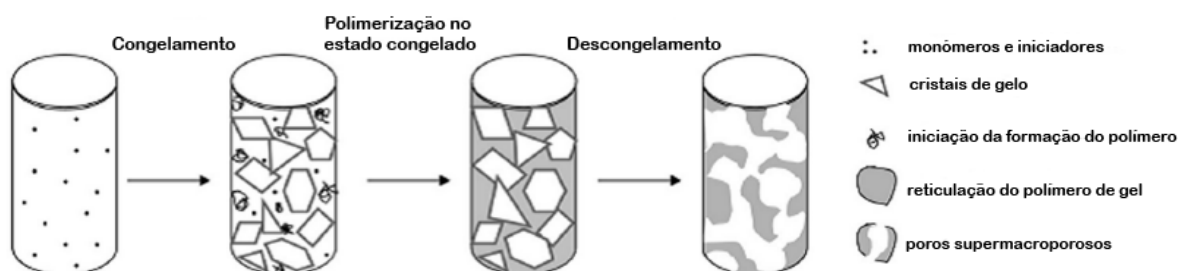


Figura 15: Representação esquemática da formação de criogéis (Adaptado de Ertürk e Mattiasson, 2014).

1.4.2. Preparação da solução de precursores de criogéis

A solução que vai ser utilizada para a preparação do criogel deve conter iniciadores da reação de polimerização como o *N,N,N',N'*-tetrametilenodiamino (TEMED) e o persulfato de amónio (APS), um agente reticulante como a *N,N'*-metileno-bis(acrilamida) (MBAAm), dois monómeros constituintes da rede estrutural do criogel, como o metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) e o metacrilato de glicidilo (GMA) e um solvente como a água (Uygun *et al.*, 2013; Perçin *et al.*, 2011). As condições de preparação dos criogéis são um passo muito importante e não devem ser alteradas porque irão modificar as características do mesmo, tais como tamanho e espessura da parede do poro, bem como outras propriedades do material (Gun'ko *et al.*, 2013).

Como referido anteriormente, soluções de polímero de alto peso molecular geram poros mais pequenos devido ao reduzido volume de água livre (Henderson *et al.*, 2013). Por este motivo, a existência de solvente entre as ligações dos polímeros é muito importante, pois assegura a difusão de substâncias solúveis em volta do criogel (Lozinsky, 2002).

1.4.3. Congelamento da solução

Quando a mistura reacional congela, esta consiste em duas partes principais: os cristais de gel e uma microfase líquida não congelada, onde se encontram concentrados os precursores do gel (Lozinsky *et al.*, 2003). A reação química ocorre nesta microfase líquida (Lozinsky *et al.*, 1982; Lozinsky *et al.*, 2003; Lozinsky *et al.*, 2007; Lozinsky *et al.*, 2002). Os cristais de gelo crescem durante o congelamento até que se forme uma rede interconectada de cristais de gelo, processo responsável pela aquisição das propriedades específicas do criogel. Quanto maior for a quantidade de solvente congelado, menor é o volume da micro-fase líquida não congelada e mais fina e densa é a parede dos poros que formam (Lozinsky, 2002; Dainiak *et al.*, 2007).

1.4.4. Descongelamento do criogel

Após um período de formação de cristais de gelo, o criogel é colocado à temperatura ambiente e, após o descongelamento dos cristais de gelo e a hidratação da rede polimérica, é obtida uma matriz tridimensional polimérica de macroporos interconectados (Henderson *et al.*, 2007; Plieva *et al.*, 2005; Lozinsky *et al.*, 2002; Plieva *et al.*, 2006; Lozinsky, 1998; Lozinsky e Okay, 2014). Uma vez que atuam como unidades formadoras de poros, a forma e tamanho dos cristais de gelo determina a forma e tamanho dos poros formados (Plieva *et al.*, 2006; Arvidsson *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2003; Plieva *et al.*, 2003; Dainiak *et al.*, 2007) e deixa um sistema contínuo de lacunas formando uma rede interconectada de poros fornecendo canais de passagem para a fase móvel (Lozinsky *et al.*, 2003; Dainiak *et al.*, 2007; Ertürk and Mattiasson, 2014).

Da mesma forma, também o tempo de descongelamento afeta as propriedades físicas dos criogéis: tempos de descongelamento mais breves resultam em géis mais fracos, e vice-versa (Damshkaln *et al.*, 1999).

1.4.4. Poli (metacrilato de 2-hidroxiétilo - metacrilato de glicidilo) [poli (HEMA-GMA)]

O polímero poli (metacrilato de 2-hidroxiétilo - metacrilato de glicidilo) (poli HEMA-GMA) é constituído por dois monómeros: o monómero metacrilato de 2-hidroxiétilo (HEMA) e o metacrilato de glicidilo (GMA).

O monómero metacrilato de 2-hidroxiétilo é um produto sintético, não tóxico e que apresenta uma força mecânica adequada à sua aplicação biotecnológica. Este monómero confere ao gel propriedades como a opacidade, elasticidade, compressibilidade e capacidade de reidratação em segundos (Özgür *et al.*, 2011). O HEMA é hidrofílico (Wichterle e Lim, 1960; Mathur *et al.*, 1996) e confere ao gel uma elevada porosidade (Mattiasson *et al.*, 2009). Este monómero apresenta grupos hidroxilo que atuam como local de ligação para diversas espécies bioativas e diferentes grupos (Kenawy *et al.*, 2002), pelo que permite a introdução de grupos epóxido na sua estrutura pela sua copolimerização com outro monómero com grupos epóxido na sua estrutura, como o metacrilato de glicidilo. Este monómero tem apresentado bons resultados em estudos de purificação de pDNA (Perçin, 2011; Özgür *et al.*; 2011; Uygun, 2013), pelo que foi escolhido para integrar a composição do criogel sintetizado neste trabalho.

O monómero metacrilato de glicidilo tem um grupo epóxido e um grupo vinílico, que lhe conferem a capacidade de reagir com uma vasta gama de moléculas e ligandos funcionais, resultando numa grande liberdade e flexibilidade para ser aplicado no “*design*” de vários tipos de polímero (Benaglia *et al.*, 2013).

A copolimerização de um monómero com outro permite o controlo do grau de grupos funcionais no produto e a sua estrutura, introduzindo as propriedades necessárias e desejadas no sistema de polímero, não comprometendo as propriedades mecânicas e osmóticas do material. Se um dos monómeros tiver um grupo funcional capaz de reagir com o grupo funcional do ligando, a copolimerização é utilizada na formação de criogéis funcionais com as propriedades desejadas (Kenawy *et al.*, 2002; Gun'ko *et al.*, 2013).

O polímero poli (metacrilato de 2-hidroxiétilo - metacrilato de glicidilo) (Figura 16) formado a partir dos monómeros HEMA e GMA permite a formação de criogéis com paredes finas e poros largos e interconectados, maiores que as moléculas de DNA, que permitem a passagem deste e da fase móvel, com uma baixa resistência ao fluxo na coluna de criogel (Özgür *et al.*, 2011; Barbey *et al.*, 2013). A presença do grupo epóxido é uma mais-valia pois reage com vários tipos de nucleófilos como carboxilos, álcoois, aminas, tióis e azidas, conferindo versatilidade aos polímeros que integra (Lillethorup *et al.*, 2014). Este polímero foi já aplicado com sucesso como matriz cromatográfica de afinidade (Altintaş e Denizli *et al.*, 2005; Altintaş *et al.*, 2007; Uygun *et al.*, 2013; Brito, 2015).

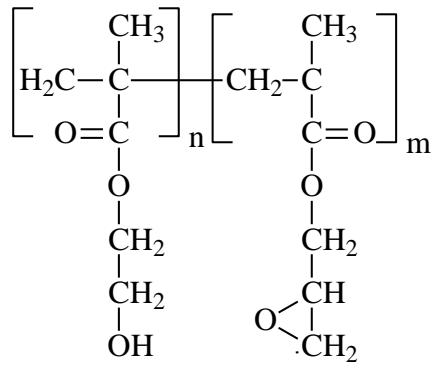


Figura 16: Poli (HEMA-GMA)

Os criogéis podem ser formados a partir de monómeros que foram previamente funcionalizados ou pela sua funcionalização com um ligando específico após a formação do criogel, através de métodos de imobilização que promovem a reação de entre grupos funcionais entre si (Kenawy *et al.*, 2002). A funcionalização de um criogel com um ligando vai promover uma afinidade específica entre o suporte cromatográfico e o pDNA (Gun'ko *et al.*, 2013). A funcionalização após a síntese do criogel é mais vantajosa porque permite a introdução de ligandos que requerem condições especiais de imobilização sem o risco de perda de atividade (Gun'ko *et al.*, 2013).

1.5. Objetivos

Neste trabalho, o principal objetivo foi o de produzir e purificar uma vacina de DNA para prevenção da gripe associada à infecção pelo vírus influenza. Para isto, propôs-se o desenvolvimento de um novo e potencialmente mais eficiente processo de purificação para as vacinas de DNA que codificam para a proteína hemaglutinina, o principal antígeno do vírus influenza, tendo como base a utilização de criogéis como suportes cromatográficos. Para atingir este objetivo é extremamente importante a seleção do ligando apropriado para obter a isoforma mais biologicamente ativa do DNA, a superenrolada. As interações entre o ligando escolhido e o pDNA são a chave para estabelecer as melhores estratégias cromatográficas para obter um produto final altamente puro, com aplicabilidade clínica. Neste contexto, o maior desafio é o de encontrar as condições de ligação e eluição que mais se ajustem ao objetivo pretendido. A maior dificuldade reside no facto de o pDNA e as impurezas do hospedeiro *E. coli* serem muito semelhantes em termos de composição, estrutura química (gDNA e RNA) e carga (endotoxinas). Tendo em mente os presentes objetivos, foi realizado neste trabalho de investigação:

- i) A síntese química de barbituratos, a serem usadas como ligandos na purificação da vacina de pDNA contra a proteína antigénica do vírus influenza;
- ii) A avaliação qualitativa e quantitativa por microscopia eletrónica de varrimento e análise elementar, dos suportes cromatográficos sintetizados;
- iii) O desenvolvimento de estudos cromatográficos preliminares com plasmídeo padrão: pVAX1lacZ de 6050 pares de bases;
- iv) O estudo dos criogéis derivatizados com os ligandos ácido barbitúrico (5, 10,0 e 40 mg/mL), ácido tiobarbitúrico (5, 10,0 e 40 mg/mL) e ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico (5, 10,0 e 40 mg/mL) nas referidas concentrações, acompanhando todos os ensaios por ensaios de controlo em suportes não derivatizados;
- v) O *screening* das condições de ligação e eluição apropriadas - força iónica e pH da fase móvel - e o seu impacto no comportamento cromatográfico;
- vi) A otimização e ajustamento das condições de ligação e eluição em amostras pré-purificadas e amostras de lisado de plasmídeo NTC 7482-41H-VA2-HÁ, manipulando as concentrações de sal e valores de pH;
- vii) A avaliação da capacidade dos suportes para separar eficientemente a isoforma superenrolada do pDNA a partir de um lisado clarificado;
- viii) A determinação do grau de pureza do pDNA que deve estar de acordo com as especificações das agências reguladoras.

Capítulo 2

Parte Experimental

2.1. Materiais, solventes e reagentes

O metacrilato de glicidilo (GMA), o persulfato de amónio (APS), o cloreto de sódio, o acetato de sódio, o azul bromofenol, o fenilisotiocianato e o cloreto de acetilo, foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), sendo a sua composição analiticamente pura. O *N,N,N,N'*-tetrametileno diamina (TEMED) foi adquiridos à Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA). O metacrilato de 2-hidroxi-etilo foi adquirido à Acros Organics (Fair Lawn, New Jersey, EUA). O ácido barbitúrico e o ácido tiobarbitúrico foram adquiridos à Merk (Darmstadt, Alemanha). O hidróxido de sódio e o diclorometano foram adquiridos à empresa José Manuel Gomes dos Santos, Lda (Odivelas, Lisboa, Portugal). O ácido clorídrico foi comprado à Fischer Scientific (Loughborough, UK). O sulfato de sódio anidro é da Pronalab. A anilina foi adquirida à DBH Chemicals, Ltd (Poole, Inglaterra). A anilina é da Panreac Química Sau (Barcelona, Espanha). Todas as soluções foram preparadas com água desionizada purificada num sistema de purificação Mili-Q da Milipore System (Bedford, Massachusetts).

O ligando 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico foi preparado de acordo com os protocolos de Lu, Schulte e Botsi e seus colaboradores (Lu *et al.*, 2015; Schulte *et al.*, 1954; Botsi *et al.*, 2007).

A agarose foi adquirida à GibcoBRL Life Technologies, o *Green Safe Premium* à NZYTech (Lisboa, Portugal) e o Loading Buffer foi adquirido à Takara Biotechnology co, Lda (Otsu, Shiga, Japão). O tampão TAE para as electroforeses foi preparado a partir de 40 mM de Tris base, 20mM de ácido acético e 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Todas as soluções utilizadas em cromatografia foram preparadas de fresco, filtradas numa membrana de 20 µm (Schleicher Schuell, Dassel, Alemanha) e sonicadas (desgaseificadas) com um aparelho de ultrassons Transsonic 460/H da Elma. O plasmídeo pVAX1LACZ[©] de 6050 pares de bases (Invitrogene, Carlsband, CA, EUA) com resistência à kanamicina foi obtido pela transformação de células competentes de estirpe *Escherichia coli* DH5α, conservada em criotubos a -80°C numa solução de 30% (v/v) de glicerol e 70% (v/v). O meio agar de Luria Bertani (Lennox) foi adquirido aos Laboratórios Conda (Madrid, Espanha). O plasmídeo que expressa a proteína hemaglutinina do vírus Influenza NTC 7482-41H-VA2 HA (6471bp) foi gentilmente cedido pela Nature Technology Corporation (Lincoln, USA). As colunas cromatográficas de polipropileno econo-pac e o adaptador de fluxo foram adquiridos à Bio-rad (Hercules, California, EUA). Os concentradores Vivaspin[®]6 de *cutoff* 10,00.000 foram adquiridos à Stedim Biotech (Goettingen, Alemanha). A

quantificação de sc pDNA foi realizada numa coluna analítica de Phenil-Sepharose®. A quantificação de proteínas foi realizada com o kit micro-BCA (“bicinchoninic acid”) de determinação de proteínas da Pierce (Rockford, EUA). O leitor de microplacas utilizado para a quantificação de proteínas é da Biochrom (Cambridge, Reino Unido).

2.2. Equipamentos

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia de camada fina (c.c.f) utilizando placas pré-revestidas com sílica gel da Macheret-Nagel Alugram® SIL G/UV₂₅₄ de 0,2 Mm, com eluente constituído por uma mistura de percentagem variável de metanol em diclorometano. Após a eluição e secagem das placas, estas foram visualizadas à luz ultravioleta de comprimento de onda (c.d.o) de 365 e 253 nm, Vilber, Loumat 312-254/ 365-254.

As placas e mantas de aquecimento utilizadas são da JP-Selecta (Abrera, Barcelona, Espanha).

O evaporador rotativo e o controlador de vácuo são da Büchi, modelo R-114/B721. A bomba de vácuo utilizada é um modelo Edwards-E. A estufa é da JP-Selecta (Abrera, Barcelona, Espanha).

As leituras de absorvância foram medidas num espectrofotómetro UV-Vis Thermo Fisher Scientific modelo Evolution 160 (Madison, Wisconsin, EUA) com células de quartzo, após a recolha das frações resultantes dos ensaios cromatográficos.

Os criogéis foram obtidos por criocongelação num banho de acetona termostaticado a -12°C da JP-Selecta (Abrera, Barcelona, Espanha).

Os suportes obtidos foram secos num forno de vidro de secagem Büchi TO-51, sob pressão reduzida e na presença de pentóxido de fósforo.

As análises qualitativas dos suportes obtidos foram efetuadas pela realização de imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) obtidas num microscópio eletrónico de varrimento HITACHI S410,00 (Tóquio, Japão).

As análises quantitativas dos suportes obtidos foram realizadas por análise elementar (AE) num analisador elementar Carlo-Erba 110,08 em Vigo, Espanha.

As absorvâncias foram medidas num espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 (Cambridge, England).

As medições de pH foram efetuadas num medidor de pH Orion Star A211 Benchtop Meters da Thermo Fischer (Lisboa, Portugal).

A centrífuga utilizado no trabalho foi uma Thermo Heraeus da Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Os géis de electroforese foram revelados na câmara de luz ultra-violeta do Sistema UVITEC (UVITEC Cambridge, Cambridge, Reino Unido) com o apoio do Software Fire Reader 1D Gel Analysis versão 15.15 (UVITEC Cambridge, Reino Unido)

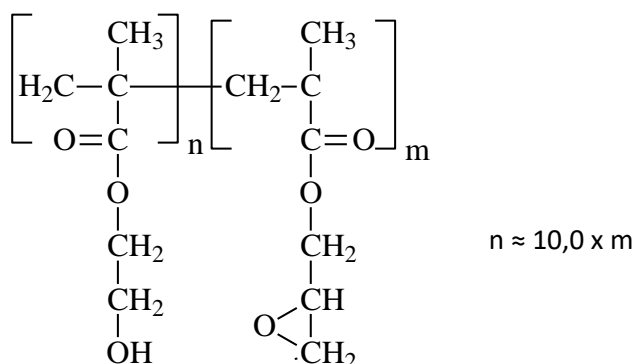
Os ensaios cromatográficos foram efetuados num sistema de “Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC) da Amersham Pharmacia Biotec (Little Chalfont, UK, Londres) equipado com um Controlador Plus LCC-501, bombas P-500, registador REC 111 e um coletor de frações FRAC-10,0, um detetor de condutividade e uma unidade ótica de UV. Foram ainda efetuados ensaios num ÄKTA Purifier da GE Healthcare Bioscience (Upssala, Suíça) processados no software UNICORN 5.11.

A pureza das amostras obtidas após purificação do lisado foi determinada num sistema ÄKTA Purifier da GE Healthcare Bioscience (Upssala, Suíça), utilizando uma coluna de Phenil-Sepharose®.

2.3. Métodos

2.3.1. Síntese do criogel poli (HEMA-GMA)

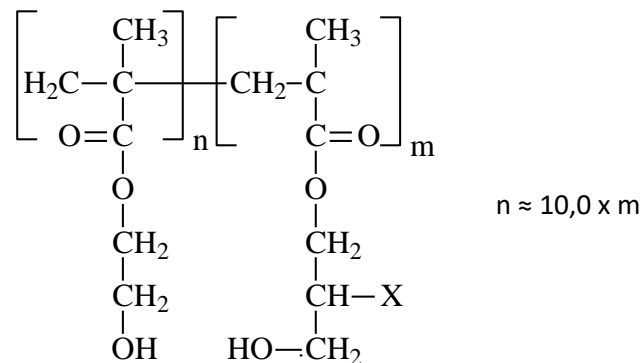
A uma solução de 0,650 mL de monómero 2-hidroxi-etil metacrilato, e 0,050 mL de monómero glicidil metacrilato em 2,50 mL de água destilada foram adicionadas 141,0 g de *N,N*-metileno-bis (acrilamida) como agente reticulante em 5,0 mL de água destilada. A esta mistura adicionou-se 0,013 mL de *N,N,N',N'*-tetrametileno diamina e 10,0 mg de persulfato de amônio para iniciar a reação, a qual foi agitada durante um minuto e imediatamente vertida para uma coluna de gravidade da Bio-rad selada de ambos os lados. A coluna com a solução de criogel foi criocongelada num banho de acetona a -12,0 °C durante 24 horas. Após 24 horas a coluna foi descongelada à temperatura ambiente e o criogel foi lavado com água destilada de modo a remover os monómeros não ligados e armazenado numa solução de azida de sódio a 2,0 % a 4,0 °C.



2.3.2. Imobilização do Ácido Barbitúrico, tiobarbitúrico e 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico ao criogel poli (HEMA-GMA) a 5,9, 10,0 e 40,9 mg/mL

Três soluções de ácido barbitúrico, tiobarbitúrico e 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico cada uma nas concentrações de 5, 10,0 e 40 mg/mL foram preparadas respetivamente com 6,60 mg, 13,20 mg e 52,80 mg; 7,20 mg, 14,0 mg e 57,60 mg; 15,0 mg, 30,0 mg e 120,0 mg e dissolvidas a quente em 3,0 mL de ácido clorídrico. Estas soluções foram vertidas para as colunas de gravidade e passadas através do criogel. As colunas com o criogel imobilizado foram colocadas durante 16 horas num banho de água destilada a 70,0 °C. Após passadas as 16 horas o criogel foi lavado com 5,0 % de ácido clorídrico e água destilada, para retirar o ligando não imobilizado ao criogel.

As colunas com o criogel imobilizado foram armazenadas numa solução de azida de sódio a 2,0 % e 4,0 °C.



X=C₄H₄N₂O₃ é ácido barbitúrico; X= C₄H₄N₂O₂S é ácido tiobarbitúrico; X= C₄H₄N₂O₂SPh₂ é ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico.

2.3.3. Produção do pDNA pVAX1-LacZ 6,05 kpb

Uma estirpe de *E. coli* DH5α contendo o plasmídeo pVAX1-LacZ 6,050 kpb (Invitrogen, Carlsband, CA, EUA) foi cultivada durante a noite num meio agar de Luria Bertani (Lennox) (Laboratórios Conda, Madrid, Espanha) suplementado com 30,0 µg/mL de kanamicina a 37,0 ° C. A estirpe *E. coli* DH5α cresceu num agitador orbital com meio Terrific Broth (20 g/L triptona, 24,0 g/L extrato de levedura, 4,0 mL/L glicerol, 0,017 M KH₂PO₄, 0,072 M K₂HPO₄) suplementado com 30,0 µg/mL de kanamicina. As células foram depois recolhidas por centrifugação no final da fase de crescimento exponencial e armazenadas a -20,0 °C até a sua utilização. As células de *E. coli* sem a presença de plasmídeo foram cultivadas na ausência de antibióticos, nas mesmas condições descritas anteriormente.

2.3.4. Lise, isolamento primário e purificação do plasmídico pVAX1-LacZ 6,05 kpb

As células contendo o plasmídeo foram lisadas usando o método alcalino. A centrifugação de uma amostra de 250,0 mL de células foi realizada a 5445 G durante 30 minutos, a 40° C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em 20,0 mL de 50,0 mM de uma solução de glucose, 25,0 mM de Tris-HCl e 10,0 mM de EDTA (pH 8,0). As células foram depois lisadas com a adição de 20,0 mL de 200,0 mM NaOH, 1,0 % (W/v) de solução de SDS. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, o material celular, gDNA e proteínas foram precipitados pela adição suave de 16,0 mL de 3,0 M de acetato de potássio pré-arrefecido (pH 5,0) e agitado cuidadosamente. O precipitado foi removido fazendo uma centrifugação dupla de 20000 G durante 30 minutos a 4,0 °C.

O plasmídeo do sobrenadante foi precipitado após a adição de 0,7 volumes de isopropanol e incubação em gelo durante 30 minutos. O pDNA foi recuperado por centrifugação a 16000 G durante 30 minutos a 4 °C. Os precipitados foram redissolvidos em 1,0 mL de solução tampão de acetato de sódio 10,0 mM (pH 5,0). A clarificação do lisado foi conseguida dissolvendo sulfato de amônio na solução tendo uma concentração final de 2,50 M, seguido de 15 minutos de incubação no gelo. As proteínas precipitadas e o RNA foram removidos por centrifugação a 10,000 G durante 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram recuperados e a concentração de ácidos nucleicos quantificada por medição da absorvância a 260,0 nm, considerando que uma unidade de absorvância corresponde a 50,0 µg/mL de plasmídeo de pDNA. O pDNA com a isoforma sc numa percentagem maior que 90 % foi obtido usando um kit da “QIAGEN Plasmid Midi Kit” (Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.5. Produção do pDNA NTC 7482-41H-VA2 HA

Uma estirpe de *E.coli* DH5α contendo o plasmídeo NTC 7482-41H-VA2 HA foi cultivada *overnight* em 250 mL de meio Terrific Broth (20,0 g/L triptona, 24,0 g/L extrato de levedura, 4,0 mL/L glicerol, 0,017 M KH₂PO₄, 0,072 M K₂HPO₄) suplementado com 30 µg/ mL de kanamicina a 37,0 ° C. O crescimento celular foi monitorizado por medição da densidade ótica OD₆₀₀ com um espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 (Cambridge, England) e suspensa na fase de crescimento exponencial a OD₆₀₀ = 10,0. As células foram centrifugadas a 12000 G por 10,0 minutos e os precipitados armazenados a -20,0 °C até à sua utilização.

2.3.6. Lise, isolamento primário e purificação do plasmídico NTC 7482-41H-VA2 HA

As isoformas de pDNA foram obtidas das células de *E.coli* por lise alcalina (Xu *et al.*, 2006) usando o Maxi Kit da QIAGEN (Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A amostra final de pDNA foi resuspendida em 50,0 mM de tampão fosfato, pH 8,0 e utilizada em ensaios cromatográficos. Esta amostra continha cerca de 90% da isoforma superenrolada e os restantes 10,0 % correspondiam à isoforma circular aberta, como se demonstrou por electroforese em gel de agarose. O lisado de *E.coli* foi preparado de acordo com o método descrito por Černigoj e colaboradores (Sousa *et al.*, 2014).

A clarificação do lisado foi levada a cabo pela adição lenta de 0,50 M de cloreto de cálcio (CaCl₂) seguida da incubação a 4 °C durante 15 minutos e centrifugação a 9000 G durante 10,0 minutos.

Por fim, o sobrenadante foi clarificado numa membrada de filtração inline Sartobran 300 filter of 0,450 mm (Goettingen, Germany).

A amostra final de pDNA (sc+oc) foi posteriormente injetada nos criogéis para estudos cromatográficos de ligação e eluição.

2.3.7. Ensaios Cromatográficos

2.3.7.1 Avaliação dos suportes cromatográficos por cromatografia de afinidade

Os suportes cromatográficos utilizados foram preparados de acordo com as condições descritas, pelo processo de criocongelamento e funcionalização por pós-modificação e por ligação do ligando a um monómero. Todos os ensaios foram acompanhados por ensaios de controlo em suportes não derivatizados.

Nos ensaios cromatográficos por gravidade foi avaliada, numa primeira fase, a capacidade de ligação dos criogéis ao pDNA utilizando os ligandos ácido barbitúrico, ácido Tiobarbitúrico e ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico, incorporados durante o processo de polimerização vinílica em diferentes densidades e aos suportes de controlo. A matriz derivatizada que apresentou melhor comportamento cromatográfico de ligação/eluição foi o criogel de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 5,0 mg/mL que foi posteriormente avaliado em termos de seletividade para as diferentes isoformas de pDNA.

Nos ensaios de seletividade foram também recolhidas frações de 0,5 mL que foram concentradas e dessalinizadas em concentradores Vivaspin® 6 e posteriormente analisadas por eletroforese em gel a 0,8% de agarose.

O pDNA utilizado nos ensaios preliminares foi o pVAX1LACZ© de 6050 pares de bases (Invitrogene™) com resistência à kanamicina obtido pela transformação de células competentes de estirpe Escherichia coli DH5α e o plasmídeo NTC 7482-41H-VA2 HA cedido pela Nature Technology Corporation (Lincoln, USA), que foram testados posteriormente em ensaios de separação de isoformas e também de purificação do lisado.

No final de cada ensaio as colunas de criogel foram lavadas com água miliQ até a condutividade ser restabelecida.

2.3.7.2. Ensaios cromatográficos por fluxo de gravidade em colunas de polipropileno econo-pac da Bio-rad

Nos ensaios cromatográficos por fluxo de gravidade a coluna foi equilibrada com 40,0 mL de solução tampão acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0 e, em seguida, injetada com 25,0 µL de

pDNA a 150,0 µg/mL após os quais se injetaram 10,0 mL de solução tampão acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0. Para eluir o DNA, a coluna foi então injetada com 10,0 mL de solução tampão acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0 com 1,0 M de cloreto de sódio. Foram recolhidas frações da coluna de 0,50 em 0,50 mL, cuja absorvância foi medida a 260 nm num espectrofotómetro de UV-Vis.. Com os valores obtidos para as absorvâncias foram elaborados os respetivos cromatogramas.

2.3.7.3. Ensaio cromatográfico no sistema cromatográfico “Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC)

Todos os ensaios cromatográficos foram levados a cabo numa coluna de polipropileno econo-pac da Bio-rad com um criogel sintetizado pelo processo de criocongelamento e funcionalização por pós-modificação e por ligação do ligando a um monómero, pelo método descrito anteriormente. Nos ensaios cromatográficos realizados através de um sistema FPLC a coluna foi equilibrada com 40,0 mL de solução tampão acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0 a um fluxo 110 mL/min e, em seguida, injetada com 25,0 µL de pDNA a 150,0 µg/mL durante 10,0 minutos para verificar a ligação e retenção do pDNA à coluna até ao momento de injeção de tampão de eluição. Para eluir o DNA, a coluna foi então injetada com solução tampão acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0 com gradiente crescente de cloreto de sódio. Todo o processo cromatográfico foi registado em forma de gráfico pelo registador do equipamento, em modo contínuo. Ao longo dos ensaios foi feita a recolha das frações correspondentes aos picos obtidos, as quais foram concentradas em concentradores Vivaspin e analisadas por eletroforese em gel de 0,80 % de agarose.

2.3.7.4. Ensaio cromatográfico no sistema cromatográfico ÄKTA purifier

Alguns dos estudos cromatográficos realizaram-se num sistema ÄKTA purifier (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suíça) a temperatura ambiente, utilizando uma unidade compacta de separação e um computador pessoal equipado com o software UNICORN 5.11. Todos os ensaios cromatográficos foram levados a cabo numa coluna de polipropileno econo-pac da Bio-rad com um criogel sintetizado pelo processo de criocongelamento e funcionalização por pós-modificação e por ligação do ligando a um monómero, pelo método descrito anteriormente. Todos os ensaios foram acompanhados por ensaios de controlo em suportes não derivatizados. A coluna foi equilibrada com 40,0 mL de solução tampão acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0 a um fluxo 1,0 mL/min e, em seguida, injetada com 500,0 µL de pDNA a 150,0 µg/mL. Para eluir o pDNA, a coluna foi então injetada com solução tampão acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0 com gradiente crescente de cloreto de sódio. Todo o processo cromatográfico foi registado em forma de gráfico em modo contínuo. Ao longo dos ensaios foi feita a recolha das frações correspondentes aos picos obtidos, as quais foram concentradas em concentradores Vivaspin e analisadas por eletroforese em gel de 0,80 % de agarose.

2.3.7.5. Regeneração da coluna de criogel

A coluna com o criogel foi periodicamente regenerada com Tampão Acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 com 3,0 M de cloreto de sódio. No final de cada ensaio as colunas de criogel foram lavadas com água miliQ até a condutividade ser restabelecida.

2.3.8. Eletroforese em Gel de Agarose

Ao longo dos ensaios cromatográficos realizados foi feita a recolha das frações correspondentes aos picos obtidos, as quais foram analisadas por eletroforese. Neste sentido, foi feito um gel com 0,8% de agarose, para o qual se pesaram 0,320 g de agarose em 40,0 mL de tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA). A mistura foi aquecida por microondas até dissolução total da agarose. Após o seu arrefecimento, foram adicionados 0,60 μ L de *green safe*. O gel foi então vertido para um berço com um pente e aguardou-se a sua solidificação.

Enquanto o gel arrefeceu e solidificou, as frações recolhidas foram colocadas em concentradores Vivaspin®6 com tampão Acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0 e estes centrifugados a 1800 G até concentrarem a 0,10 μ L. Foram então feitos eppendorfs para cada amostra e para a amostra inicial. Para o eppendorf da amostra inicial foram pipetados 3 μ L de *loading buffer*, 2,0 μ L de DNA plasmídico e 15,0 μ L de tampão Acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0. Para os eppendorfs das frações recolhidas foram pipetados 2,0 μ L de *loading* e 20,0 μ L de amostra dos concentradores e foram levados para eletroforese.

O gel já solidificado foi colocado na tina, sem o pente, e as amostras foram pipetadas para os poços. A tina foi fechada e colocada a correr a 120,0 mA durante 30 minutos, com tampão TAE como tampão de corrida.

Ao fim deste tempo o gel foi revelado na câmara de luz ultravioleta do Sistema UVITEC (UVITEC Cambridge, Cambridge, Reino Unido) com o apoio do Software Fire Reader 1D Gel Analysis versão 15.15 (UVITEC Cambridge, Reino Unido)

2.3.9. Quantificação da isoforma superenrolada do pDNA

A avaliação das moléculas de RNA, gDNA, oc pDNA e sc pDNA presentes no amostra pré-purificada e nas frações de sc pDNA purificadas foi levada a cabo através da aplicação de um método quantitativo modificado usando uma coluna analítica de Phenil-Sepharose® (Diogo *et al.*, 2003). Este processo foi realizado utilizando um sistema ÄKTA purifier (GE Healthcare Bioscience, Upsala, Suíça). Como representado na Figura 17 a curva de calibração foi realizada com concentrações padrão de pDNA de 1,0 a 10,00 μ g/mL. Os padrões de pDNA foram

preparados por diluição da maior concentração de pDNA puro com 10,0 mM de tampão Tris-HCl pH 8 e a sua concentração confirmada no espectrofotómetro Ultrospec 3000 UV/visível (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). A coluna analítica de pDNA Phenil-Sepharose® foi equilibrada com sulfato de amónio em 10,0 mM de tampão Tris-HCl pH 8,0. Após a injeção de 20,0 µL de amostra a 1,0 mL/min, esta foi analisada pelo método HIC o que levou à eluição de todas as espécies do pDNA. A análise dos picos obtidos durante os ensaios analíticos permitiu o cálculo do grau de pureza e recuperação. O grau de pureza é definido como a percentagem da área do pico de sc pDNA relacionada com a área total de todos os picos do cromatograma analítico. O rendimento de recuperação foi calculado como o rácio entre a concentração de sc pDNA obtido e a concentração de sc pDNA presente na amostra de lisado.

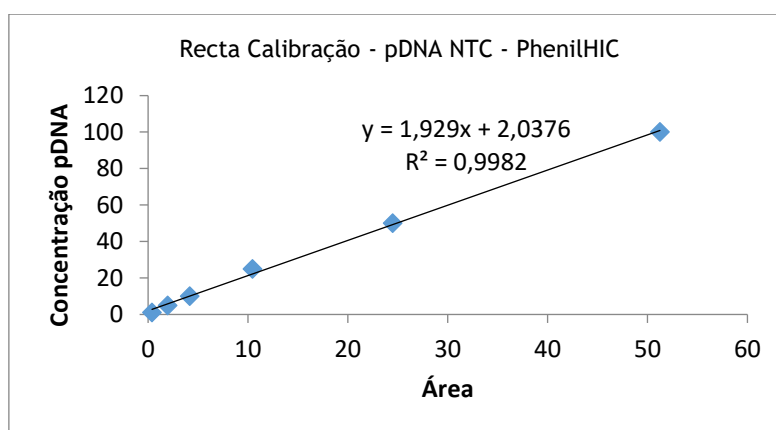


Figura 17: Recta de calibração com padrões de pDNA (1,0 a 50,0 µg/mL).

2.3.10.0. Quantificação de proteínas

O conteúdo de proteínas presente nas amostras foi quantificado através de micro-BCA (“bicinchoninic acid”) pelo kit de determinação de proteínas da Pierce (Rockford, EUA). A quantificação consiste na adição de 200,0 µL de reagente BCA a 50,0 µL de amostra numa microplaca. Após 30 minutos de incubação a 60,0 °C mediu-se a absorvância a 570 nm num leitor de microplacas (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A recta de calibração (Figura 18) foi construída tomando como padrão albumina de soro bovino (BSA) (10,0 µg/mL a 100,0 µg/mL).

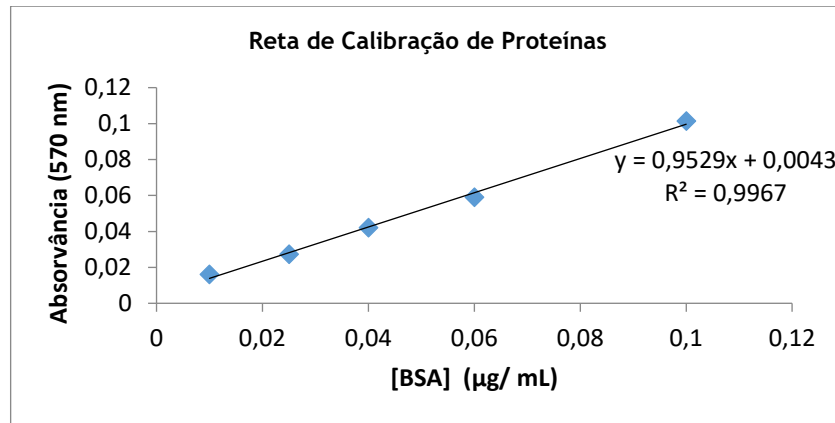


Figura 18: Curva de referência com padrões de Albumina sérica bovina (10,0 µg/mL a 10,00 µg/mL).

Capítulo 3

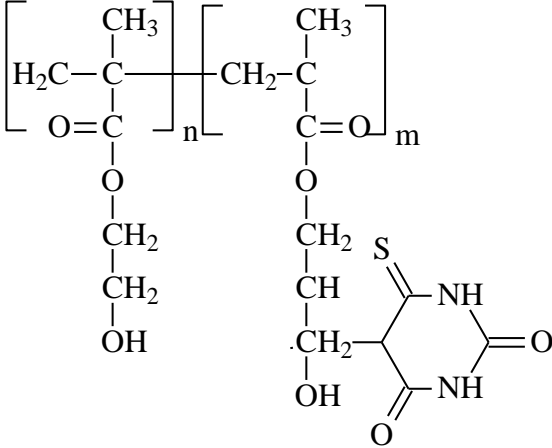
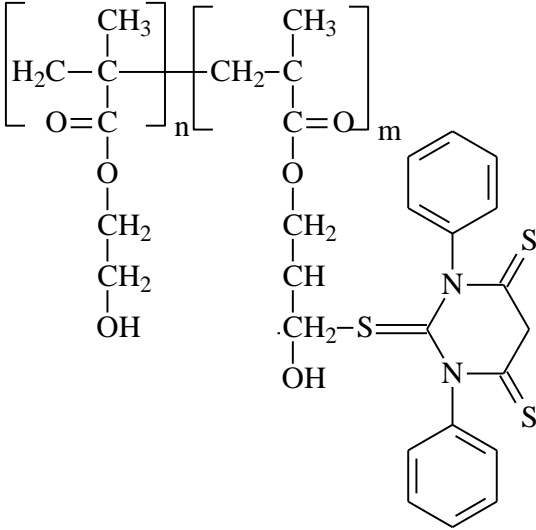
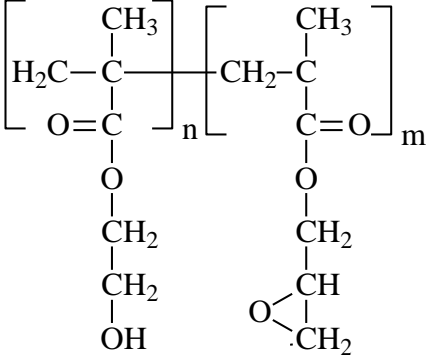
Resultados e Discussão

3.1. Imobilização dos Criogéis

Neste trabalho foram sintetizados nove criogéis pelo método de pós-imobilização e o respetivo suporte de controlo não derivatizado, na ausência de ligando (Tabela 4). Para isso foram feitas soluções de 5,0, 10,0 e 40,0 mg/mL de ácido barbitúrico, ácido tiobarbitúrico e ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico, dissolvidas a quente em ácido clorídrico. Estas soluções foram vertidas para as colunas de gravidade, passadas através do criogel e colocadas num banho de água destilada a 70,0 °C durante 16 horas, após as quais o criogel foi lavado com 5,0 % de ácido clorídrico e com água destilada, para retirar o ligando não ligado ao criogel. As colunas com o criogel imobilizado foram armazenadas posteriormente numa solução de azida de sódio a 2,0 % e 4,0 °C.

Tabela 4: Criogéis funcionalizados (n=10,0 x m)

Criogel	Estrutura	Concentrações do ligando (mg/mL)
Criogel Ácido Barbitúrico (Criogel HWMA-GMA-Ácido Barbitúrico)		5,0
		10,0
		40,0

<p>Criogel Ácido Tiobarbitúrico (Criogel HWMA-GMA-Ácido Tiobarbitúrico)</p>		<p>5,0 10,0 40,0</p>
<p>Criogel Ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico (Criogel HEMA-GMA-Ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico)</p>		<p>5,0 6,0 7,0 8,0 9,0 10,0 40,0</p>
<p>Criogel poli (HEMA-GMA) Suporte de Controlo</p>		<p>$n \approx 10,0 \times m$</p>

Os suportes imobilizados e o suporte de controlo foram analisados e caracterizados por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e por análise elementar. A análise mais detalhada permitiu diferenciar os criogéis e distinguir as diferentes concentrações de ligando usado.

3.2 Caracterização dos suportes cromatográficos

3.2.1. Capacidade de reidratação por “Swelling degree”

Quando o criogel é comprimido manualmente ou seco em estufa liberta a água acumulada no interior dos seus poros. Quando este é novamente submergido em água re-hidrata rapidamente, atingido o tamanho e forma originais em poucos segundos.

A capacidade de reidratação dos criogéis foi também determinada. Para isto, foi determinado o peso do criogel molhado e este foi, em seguida, seco na estufa a 40,0 °C durante 72 horas. Após este período de tempo foi pesada a massa do criogel seco e calculado aproximadamente o seu grau de porosidade.

O criogel poli (HEMA-GMA) em questão apresenta capacidade de reidratação traduzida por um grau de porosidade de 6,860 g H₂O/g criogel, que está de acordo com os valores descritos na literatura (Uygun *et al.*, 2013).

Tabela 5: Capacidade de reidratação do criogel poli(HEMA-GMA)

	Criogel poli (HEMA-GMA)	Criogel (HEMA) (Brito, 2015)	Criogel poli (HEMA-GMA) (Uygun <i>et al.</i> , 2013)
Grau de reidratação (g / H ₂ O/g criogel)	6,860	6,80	5,540

3.2.2. SEM e Análise elementar

O estudo dos criogéis por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) permitiu a caracterização da morfologia e perceção da estrutura, bem como o tamanho dos poros dos diferentes criogéis. Para tal foram efetuadas imagens de SEM das diferentes concentrações de ácido barbitúrico, tiobarbitúrico e 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico e o respetivo suporte de controlo não derivatizado.

A técnica de análise elementar (AE) baseia-se na quantificação dos átomos de azoto, carbono, hidrogénio e enxofre ou bromo presentes na constituição química dos compostos. Assim, é possível calcular a quantidade de ligando ligado ao criogel e a sua densidade, de acordo com a seguinte equação (adaptado de Caramelo-Nunes *et al.*, 2012).

$$Q = \frac{\%N}{m \text{ matriz}}$$

Tabela 6: Análise elementar das criogéis ácido barbitúrico, tiobarbitúrico e 1,3 difenil-2-tioarbitúrico (5,0, 10,0 e 40,0 mg/mL)

	Ácido Barbitúrico [5,0 mg/mL] (2 azotos - MW 128,090 g/mol)		Ácido Barbitúrico [10,0 mg/mL] (2 azotos - MW 128,090 g/mol)		Ácido Barbitúrico [40,0 mg/mL] (2 azotos - MW 128,090 g/mol)		Ácido Tioarbitúrico [5,0 mg/mL] (2 azotos - MW 144,15 g/mol)		Ácido Tioarbitúrico [10,0mg/mL] (2 azotos - MW 144,150 g/mol)		Ácido Tioarbitúrico [40,0 mg/mL] (2 azotos - MW 144,150 g/mol)		Ácido 1,3 difenil-2-tioarbitúrico [5,0 mg/mL] (2 azotos - MW 176.220 g/mol)		Ácido 1,3 difenil-2-tioarbitúrico [10mg/mL] (2 azotos - MW 176.22g/mol)		Ácido 1,3 difenil-2-tioarbitúrico [40,0 mg/mL] (2 azotos - MW 176.220 g/mol)		Suporte de Controle	
	%N	Q	%N	Q	%N	Q	%N	Q	%N	Q	%N	Q	%N	Q	%N	Q	%N	Q	%N	Q
	2.730	0.975	3.130	1.118	3.030	1.082	2.840	1.014	3.040	1.089	3.220	1.150	2.820	1.007	2.700	0.857	3.280	1.171	2.80	1,0
	2.780	0.993	3.130	1.118	3.010	1.075	2.80	1,0	2.980	1.064	3.030	1.082	2.830	1.011	2.590	0.925	3.270	1.168	2.880	1.028
Média		0.984		1.118		1.079		1.007		1.077		1.116		1.009		0.891		1.170		1.014
mg ligando imobilizado/g criogel	126.004		143.204		138.209		145.159		155.250		160.871		177.806		157.012		206.177			

Os dados obtidos por análise elementar são utilizados na construção de uma tabela comparativa do ligando imobilizado e da estrutura dos criogéis.

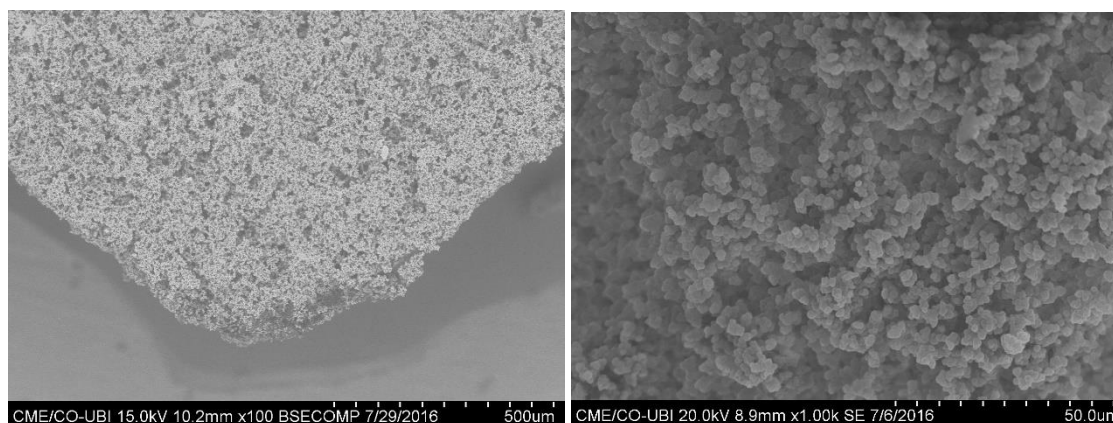


Figura 19: Imagem SEM do criogel de controle com ampliação 10 x e 1000 x;

Pela análise das imagens de SEM podemos verificar que o criogel não derivatizado apresenta uma estrutura em esferas

Tabela 7: Tabela comparativa da concentração dos criogéis, da concentração de ligando imobilizado determinada por análise elemental e da estrutura dos criogéis do ácido barbitúrico na ampliação de 100 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita).

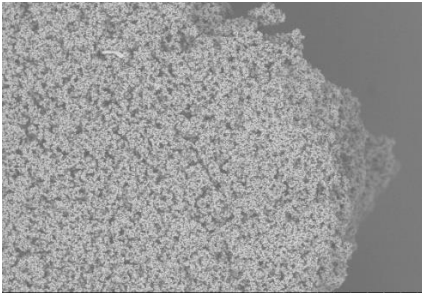
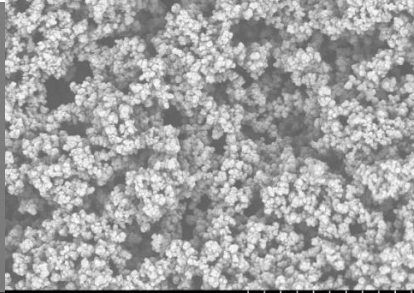
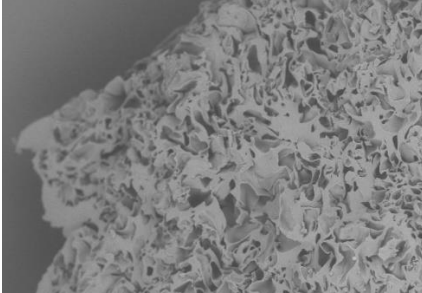
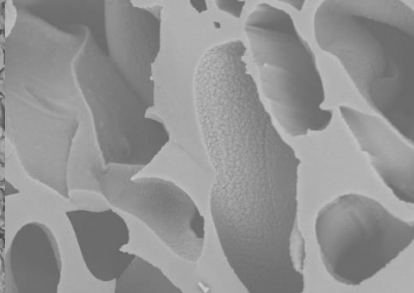
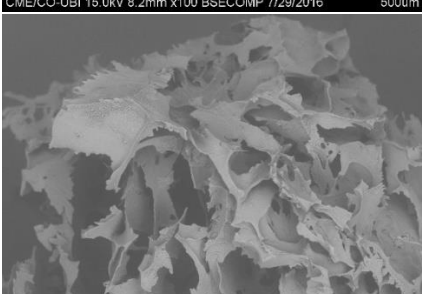
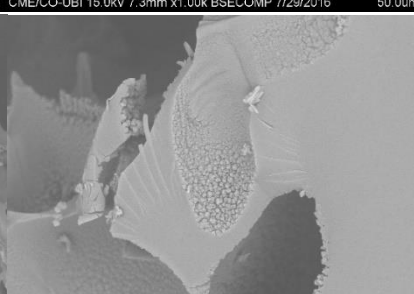
		Concentração de ligando (mg/mL)	Concentração de ligando imobilizado determinada por AE (mg ligando imobilizado /g criogel)
		5,0	126,004
		10,0	143,204
		40,0	138,209

Tabela 8: Tabela comparativa da concentração dos criogéis, da concentração de ligando imobilizado determinada por análise elementar e da estrutura dos criogéis do ácido tiobarbitúrico na ampliação de 100 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita).

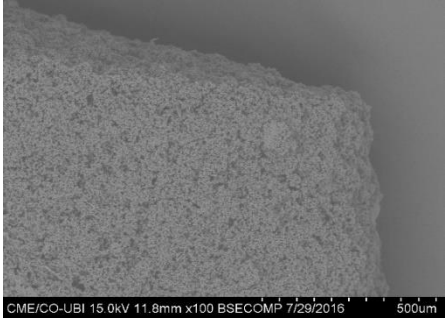
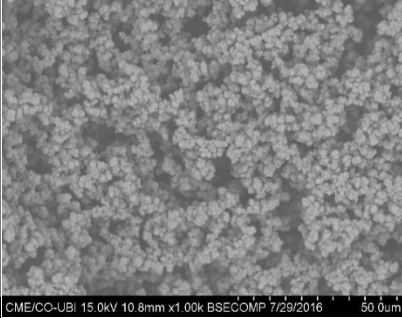
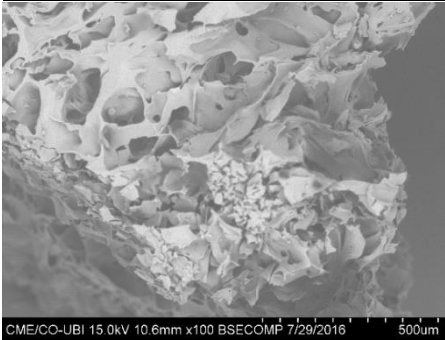
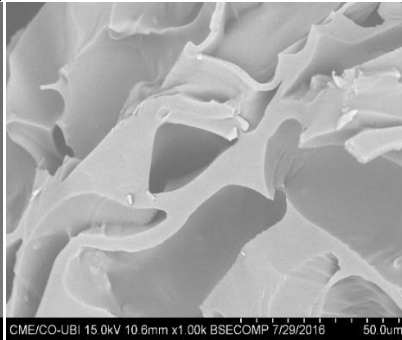
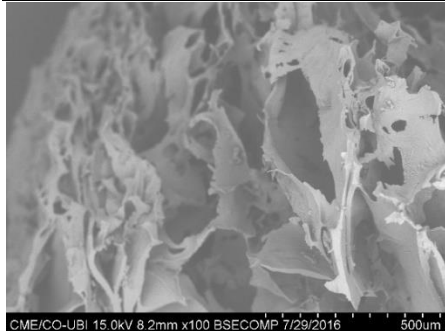
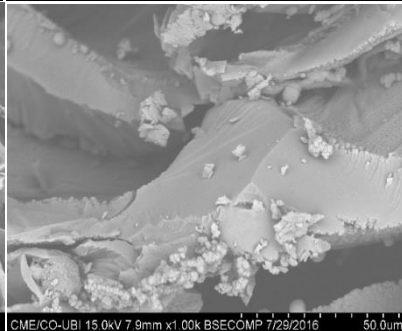
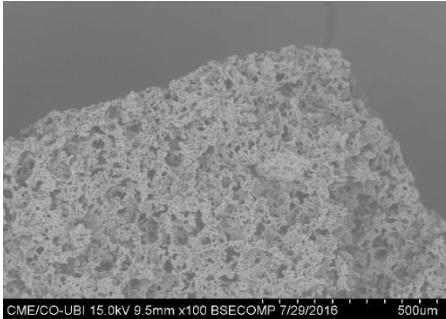
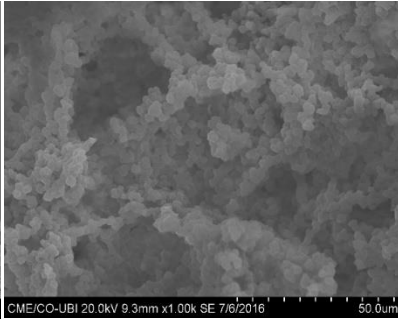
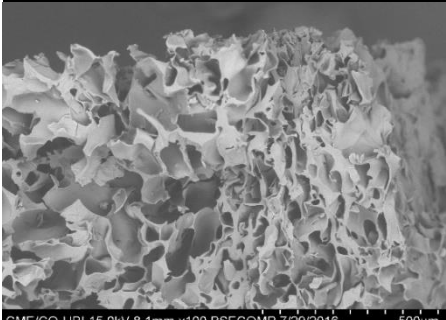
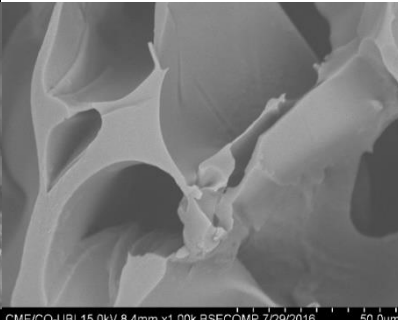
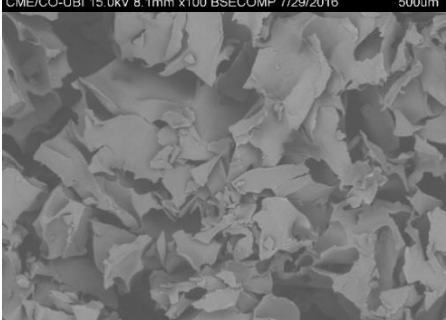
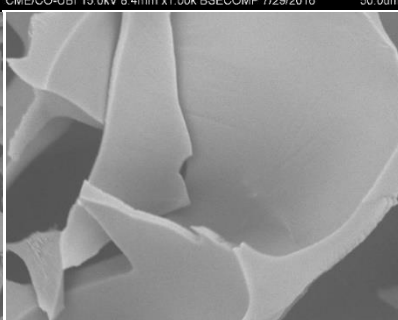
		Concentração de ligando (mg/mL)	Concentração de ligando imobilizado determinada por AE (mg ligando imobilizado)
		5,0	145,159
		10,0	155,250
		40,0	160,871

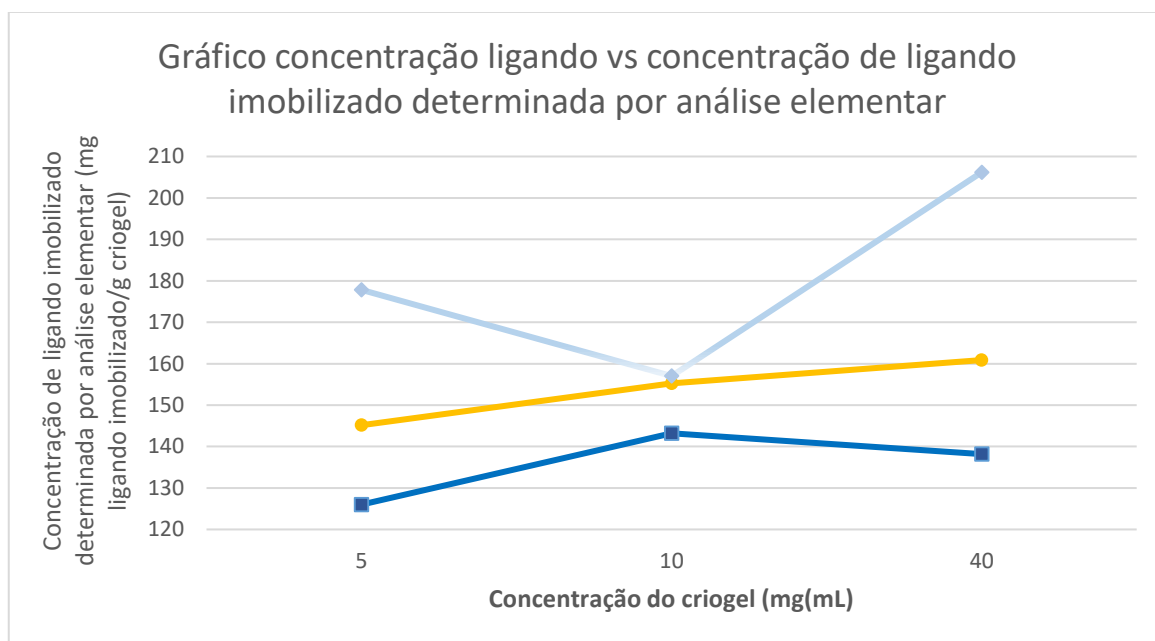
Tabela 9: Tabela comparativa da concentração dos criogéis, da concentração de ligando imobilizado determinada por análise elementar e da estrutura dos criogéis do ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico na ampliação de 10,00 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 10,000 x (imagem à direita).

		Concentração de ligando (mg/mL)	Concentração de ligando imobilizado determinada por AE (mg ligando imobilizado /g criogel)
		5,0	177,806
		10,0	157,012
		40,0	206,177

Como se pode constatar pela análise da Figura 19 e das tabelas 7, 8 e 9, os criogéis são estruturas macroporosas com canais interconectados. Tanto os criogéis, com os ligandos imobilizados e o suporte de controle não apresentam deformações na sua morfologia, contendo todos eles poros que vão entre os 10,0 μm e os 10,0 μm , tal como descrito na literatura (Lozinsky *et al.*, 2003).

Pela análise das imagens de SEM podemos verificar que o criogel imobilizado com 5,0 mg/mL de ácido barbitúrico tem uma estrutura em esferas, em contraste com os criogéis imobilizados com 10,0 e 40,0 mg/mL deste composto que apresentam uma estrutura lamelar. Analisando esta estrutura e tendo em conta o propósito da bioseparação para o qual as matrizes foram sintetizadas, podemos verificar que os criogéis com estrutura em esfera apresentam uma maior área no interior do criogel na qual a fase móvel pode passar e ligar. De facto, uma camada densa de ligandos imobilizados pode impedir o acesso do ligando aos locais de ligação do pDNA e, conseqüentemente, impedir o seu reconhecimento entre elas, levando a uma fraca retenção (Silva *et al.*, 2010,0), facto visível também nos estudos cromatográficos a seguir abordados.

As concentrações reais de ligando imobilizado, calculadas por análise elementar foram comparadas com a concentração dos criogéis sob a forma de um gráfico.



◆ Ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico ● Ácido tiobarbitúrico ■ Ácido barbitúrico

Figura 20: Concentração do criogel vs concentração de ligando imobilizado determinada por análise elementar.

Através da análise das Tabelas 7, 8 e 9 e da Figura 20, podemos verificar que, para o criogel de ácido barbitúrico, a concentração real de ligando imobilizado é maior no criogel de 10,0 mg/mL, comparativamente ao de 40,0 mg/mL. No entanto é maior nestes relativamente ao criogel de 5,0 mg/mL do mesmo composto, o que está de acordo com os resultados estruturais e com os perfis cromatográficos.

Os estudos de análise elementar aos criogéis de ácido tiobarbitúrico revelam que estes são os únicos cujo aumento de ligando real imobilizado acompanha o aumento de concentração utilizada na imobilização (Figura 20). Mesmo assim, enquanto que do criogel de 5,0 para o 10,0

mg/mL e do de 10,0 mg para o de 40mg/mL o aumento deveria ser grande (para o dobro e para o quádruplo respetivamente), na realidade a concentração de ligando imobilizado não acompanha o aumento da mesma forma, havendo um aumento na ordem dos 7,0 % de uns para os outro (Tabela 8).

Relativamente ao criogel de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico, a densidade real de ligando imobilizado é maior para o criogel de 5,0 mg/mL que para o de 10,0 mg/mL, como podemos verificar através da análise da reta para o do respetivo composto na Figura 20, o que se torna contraditório com a estrutura do criogel, avaliada por imagens de SEM.

Estes resultados levam a crer que a amostra recolhida para análise elementar pode não ser representativa e, por este motivo, os testes de análise elementar deveriam ser repetidos.

Uma vez que o suporte de controlo e qualquer um dos três ligandos com densidade de ligando menor, de 5,0 mg/mL têm estrutura em forma de esferas, enquanto que os criogéis derivatizados com densidades de ligando de 10,0 e 40,0 mg/mL têm uma estrutura diferente, em forma lamelar, pode afirmar-se que a quantidade de ligando imobilizado afeta a estrutura do criogel. Por este motivo, e para perceber como evolui a estrutura dos criogéis em função da densidade de ligando imobilizado, foram sintetizados e derivatizados também criogéis de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico nas concentrações de 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0 mg/mL e obtidos os resultados a seguir apresentados (Figuras 21 a 24)

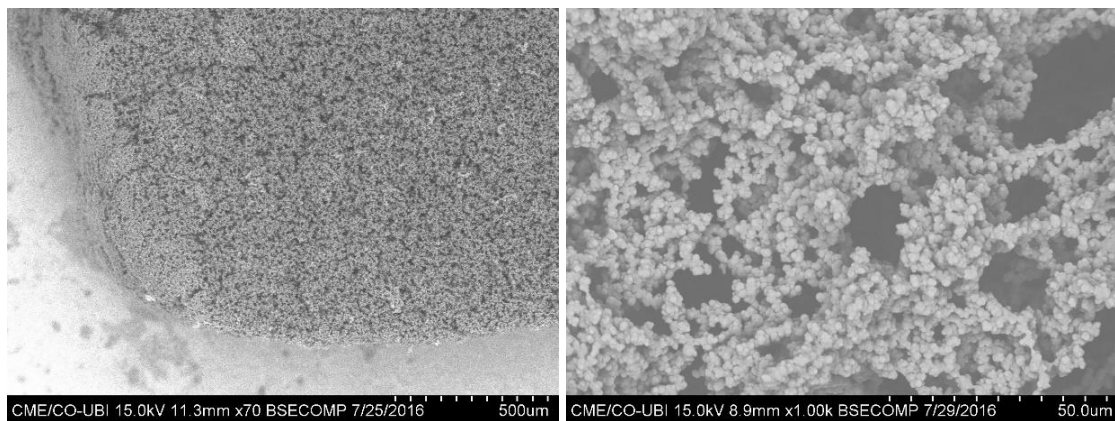


Figura 21: Imagem SEM do criogel de Ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 6mg/mL com ampliação de 70 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita).

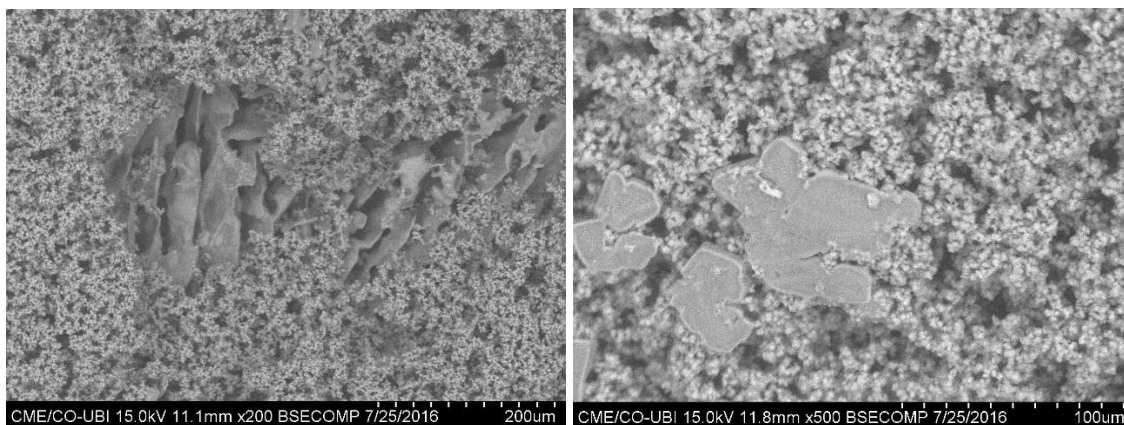


Figura 22: Imagem SEM do criogel de Ácido 1,3-difenil-2-tioarbitúrico 7,0 mg/mL com ampliação de 200 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 500 x (imagem à direita).

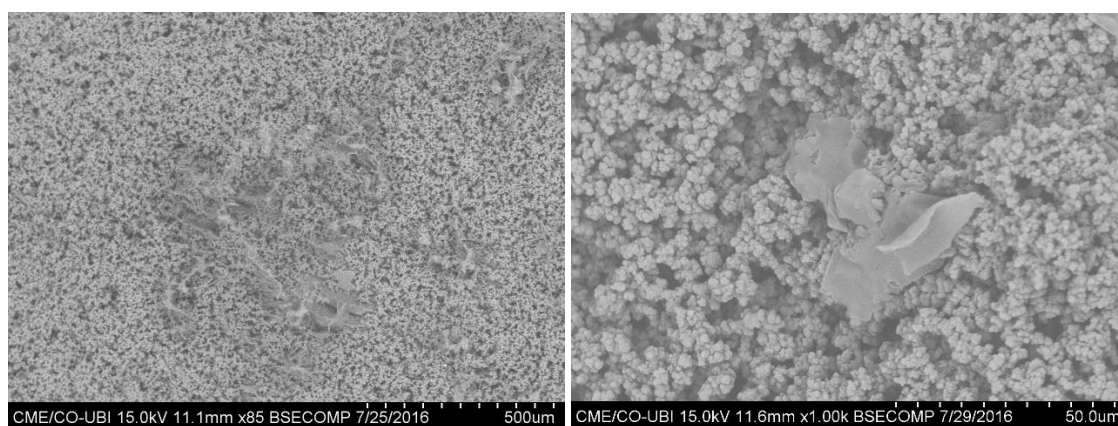


Figura 23: Imagem SEM do criogel de Ácido 1,3-difenil-2-tioarbitúrico 8,0 mg/mL com ampliação de 85 x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita)

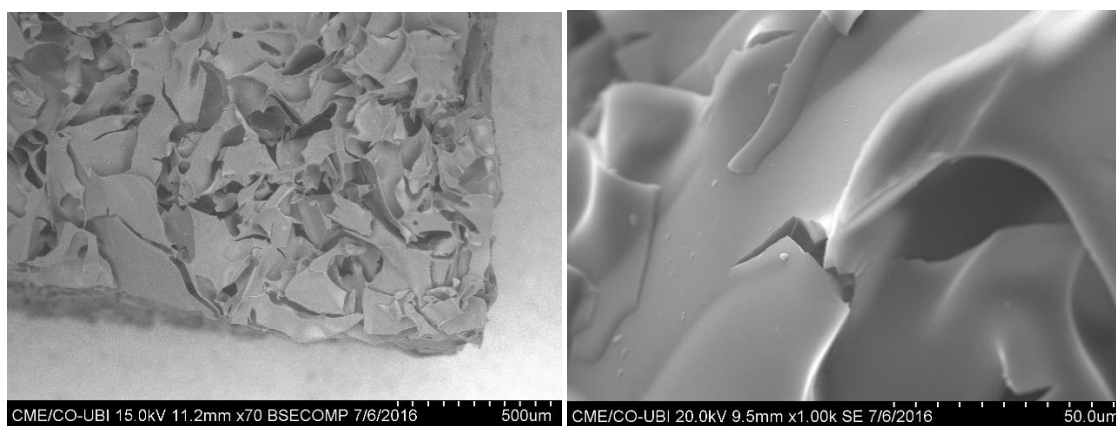


Figura 24: Imagem SEM do criogel de Ácido 1,3-difenil-2-tioarbitúrico 9,0 mg/mL com ampliação de 70x (imagem à esquerda) e na ampliação de 1000 x (imagem à direita).

Pelos resultados podemos então perceber que a estrutura do criogel de 6,0 mg/mL é semelhante à do criogel com 5,0 mg/mL, em forma de esferas, e que a estrutura do criogel de 9,0 mg/mL é semelhante à do criogel de 10,0 mg/mL, em forma lamelar. Nos criogéis de

concentração intermédia, 7,0 e 8mg/mL, coexistem ambas as estruturas. Nestes criogéis de concentrações intermédias pode ver-se claramente a estrutura a modificar e a passar lentamente de esferas a lamelas, à medida de que a densidade de ligando imobilizado aumenta.

3.3. Estudos preliminares de cromatografia de afinidade por fluxo de gravidade

Os ensaios de cromatografia de afinidade foram realizados nos criogéis derivatizados e também nos respectivos suportes de controlo (criogel poli (HEMA-GMA)) na ausência de ligando. O estudo das interações da afinidade foi realizado através de ensaios cromatográficos em colunas de polipropileno Econo-pac da Bio-rad com os criogéis sintetizados, tendo como objetivo verificar a existência de interações entre o plasmídeo pVAX1-LacZ e os ligandos derivados de barbituratos immobilizados numa matriz polimérica de criogel. As interações predominantes esperadas são as iónicas devido à estrutura iónica do ligando. Os resultados preliminares obtidos por cromatografia de afinidade por fluxo de gravidade não foram conclusivos, pelo que se passou para os estudos cromatográficos em sistema FPLC.

3.4. Ensaios cromatográficos no sistema FPLC

Os ensaios cromatográficos realizados por FPLC usaram como amostra uma solução de pDNA PVAX1-LacZ pré-purificada com o kit “QIAGEN Plasmid Midi Kit” com o objetivo de verificar a seletividade dos criogéis para as isoformas sc e oc. Para estes ensaios foram seguidos os passos descritos no ponto 3.7.3.

3.4.1. Ensaios cromatográficos com o criogel poli (HEMA-GMA) (suporte de controlo)

A coluna de criogel com o suporte de controlo (criogel poli (HEMA-GMA)) foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e foram injetados 25,0 μ L de pDNA pVAX1-LacZ com a concentração de 10,00 μ g/mL (Figura 25). Verificou-se a obtenção de um pico que mostra que o suporte de controlo não liga o pDNA na sua matriz, sendo eluído logo no início, o que demonstra que a interação ente o plasmídeo e o suporte não é forte o suficiente para ligar o pDNA. Após a obtenção deste pico injetou-se na coluna tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 com 2,50 M de NaCl para verificar se não ficou ligado algum plasmídeo que pudesse ainda eluir. A inexistência de um pico demonstra que, de facto, o suporte não ligou nenhum do pDNA, pelo pode ser utilizado como matriz cromatográfica para posterior derivatização com ligandos específicos.

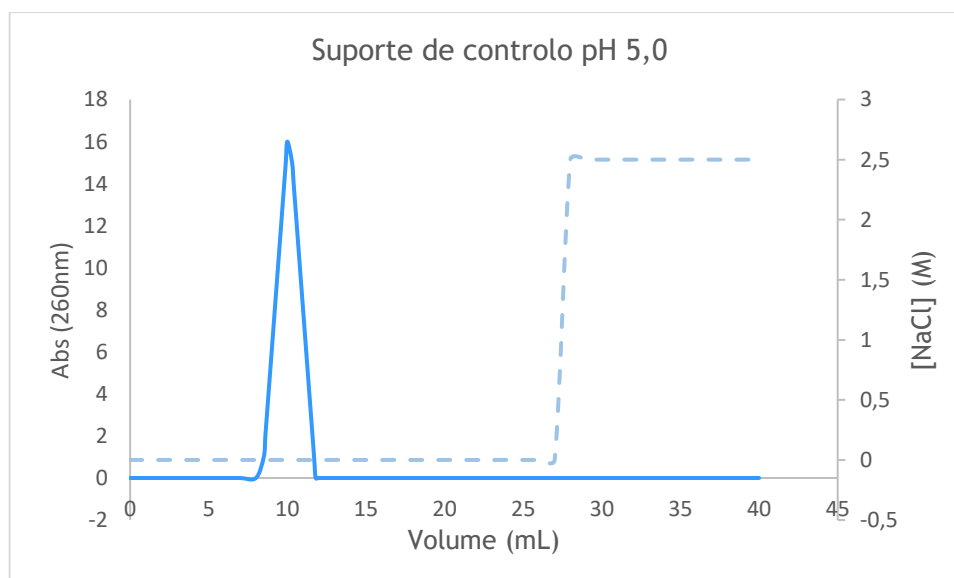


Figura 25: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de controlo. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25 μ L.

3.4.2 Ensaios cromatográficos com criogel ácido barbitúrico

Para os ensaios de cromatografia de afinidade por FPLC com o criogel funcionalizado com ácido Barbitúrico, foram utilizadas três concentrações distintas de ligando (40, 10,0 e 5,0 mg/mL). A coluna com o criogel foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0 mM, a diferentes pHs e foram injetados 25 µL de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ a 10,00 µg/mL, seguindo-se os passos de eluição descritos no ponto 3.7.4.

3.4.2.1 Ensaios cromatográficos com o criogel ácido barbitúrico 40 mg/mL

A coluna de criogel funcionalizada com 40mL de Ácido Barbitúrico foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0 mM a diferentes valores de pH (pH 5,0, pH 7,0 e pH 10,0) e foram injetados 25,0 µL de pDNA pVAX1-LacZ a 10,0 µg/mL. Em todos os casos se verificou a obtenção de um pico logo ao início (Figura 26) que mostra que o criogel não liga o pDNA na sua matriz, o que demonstra que não há interação ente o plasmídeo e o suporte para ligar o pDNA. Este facto pode ser explicado pela elevada densidade de moléculas de ácido barbitúrico no criogel, impedindo assim a ligação ao plasmídeo. Após a obtenção deste pico injetou-se na coluna tampão acetato de sódio 10,0 mM com 2,50 M de NaCl para verificar que não ficou ligado algum plasmídeo que pudesse ainda eluir. A inexistência de um pico demonstra que, de facto, o suporte não ligou nenhum do pDNA, pelo que não pode ser considerado um bom suporte cromatográfico. Conclui-se também que a variação dos valores de pH do tampão não altera as condições de eluição do suporte e, por esse motivo, os restantes suportes com este ligando foram testados apenas a pH5.

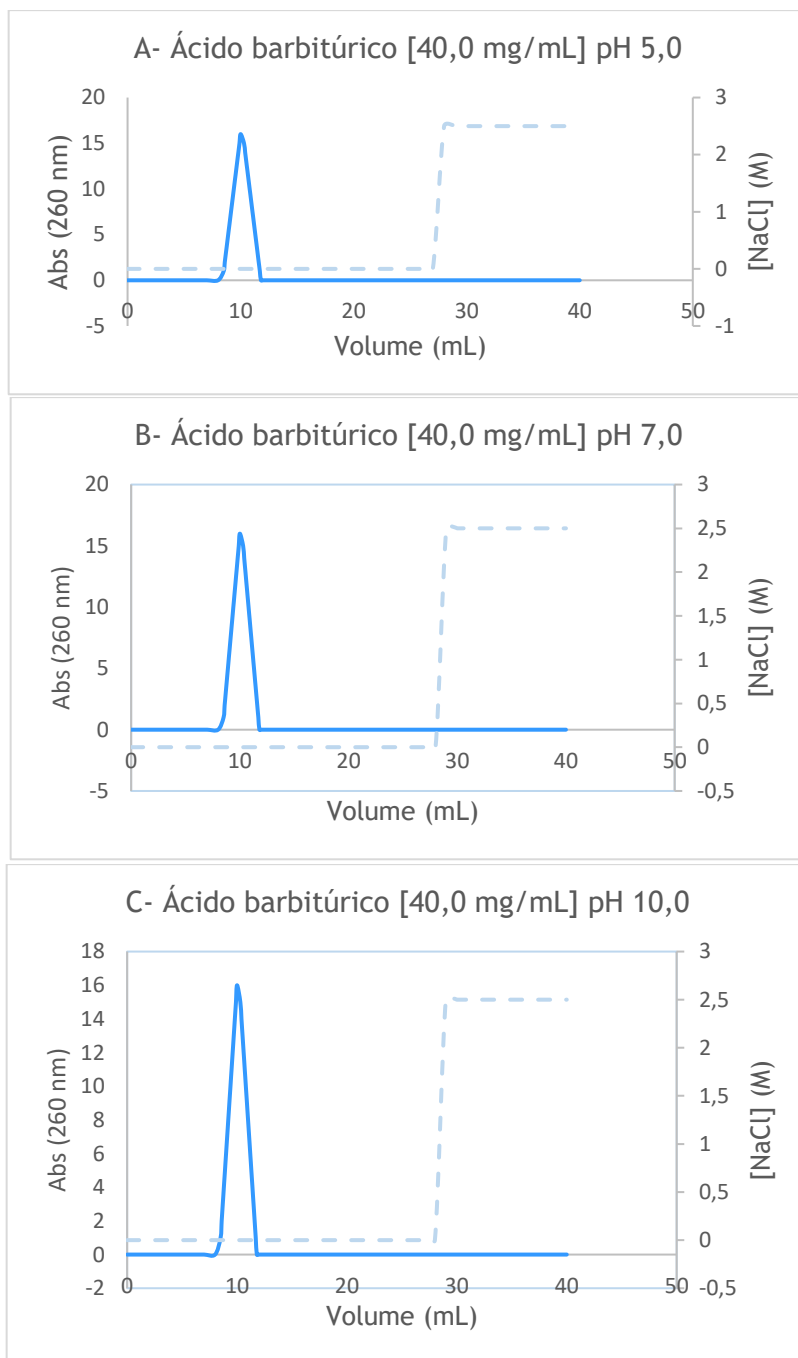


Figura 26: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido barbitúrico 40mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 em A, pH 7,0 em B e pH 10,0,0 em C; a eluição com 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM aos mesmos valores de pH, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 μ L.

3.4.2.2 Ensaios cromatográficos com o criogel ácido barbitúrico 10,0 mg/mL

Este suporte foi equilibrado com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e foram injetados 25,0 μ L de pDNA pVAX1-LacZ a 10,00 μ g/mL verificando-se que esta matriz não liga o pDNA, pois este é imediatamente eluído após a injeção (Figura 27), o que demonstra uma fraca interação entre o suporte e o plasmídeo. Apesar de não haver retenção de pDNA, injetou-se na

coluna tampão acetato de sódio 10,0 mM pH5 com 2,50 M de NaCl para confirmar que não ficou ligado nenhum plasmídeo. Como não eluiu nenhum outro pico pode verificar-se que o suporte não liga pDNA, pelo que se passou ao estudo de outro suporte do mesmo ligando, mas como uma concentração inferior.

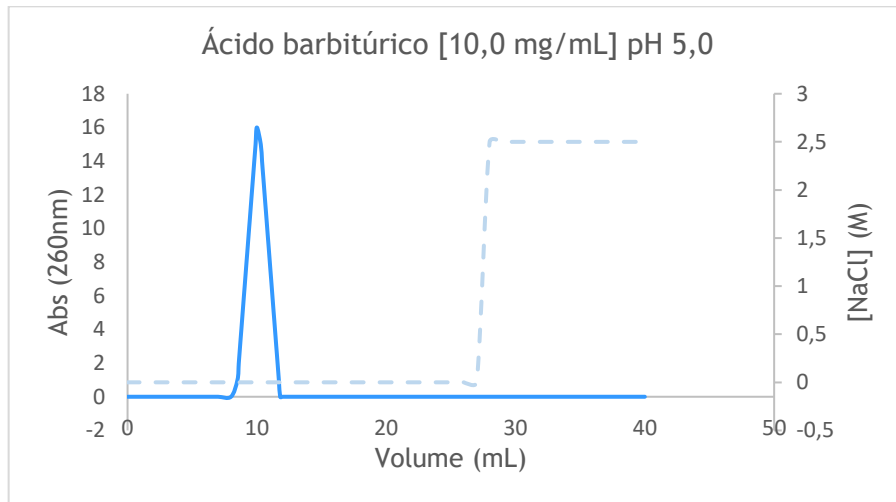


Figura 27: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido barbitúrico 10,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25 μ L.

3.4.2.3 Ensaios cromatográficos com o criogel ácido barbitúrico 5,0 mg/mL

O criogel funcionalizado com inferior densidade de ácido barbitúrico (5,0 mg/mL) foi testado e observou-se que, após a injeção de 25,0 μ L de pDNA pVAX1-LacZ, elui logo um pico o que demonstra uma fraca interação entre o plasmídeo e o suporte (Figura 28). A injeção de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 com 2,50 M de NaCl na coluna confirmou que não ficou ligado nenhum plasmídeo, uma vez que não foi detetado mais nenhum pico.

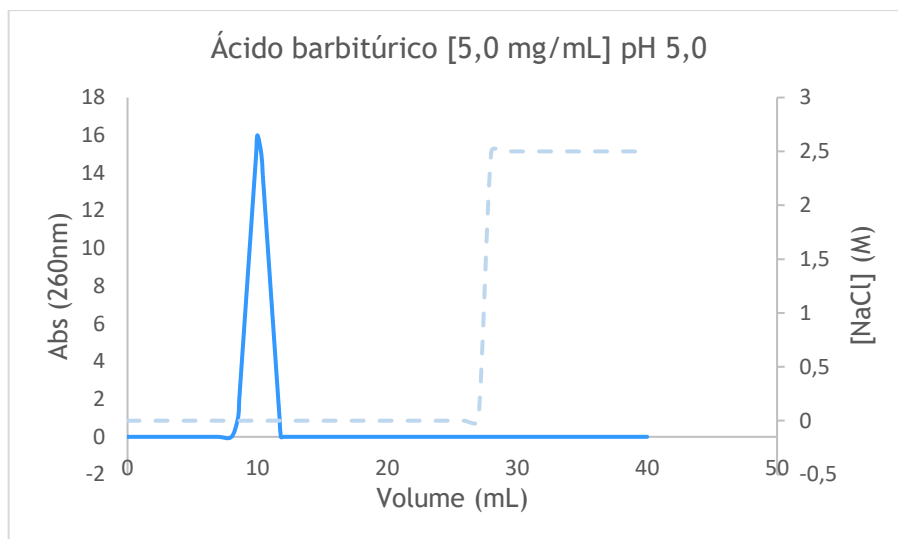


Figura 28: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetado na coluna de criogel de ácido barbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 μ L.

A inexistência de bons resultados com estes suportes, motivou a passagem aos estudos cromatográficos com uma matriz derivatizada com ácido tiobarbitúrico.

3.4.3 Ensaios cromatográficos com criogel ácido tiobarbitúrico

Para os ensaios de cromatografia de afinidade por FPLC com o criogel funcionalizado com ácido tiobarbitúrico, foram usadas três concentrações distintas de ligando (40,0, 10,0 e 5,0 mg/mL). A coluna com o criogel foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0 mM diferentes valores de pH e foi injetado pVAX1-LacZ, seguindo-se os passos de eluição descritos no ponto 3.7.3.

3.4.3.1 Ensaios cromatográficos com o criogel ácido tiobarbitúrico 40,0 mg/mL

A coluna de criogel funcionalizada com 40,0 mL de ácido tiobarbitúrico foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0 mM a pH 5,0 e foram injetados 25,0 μ L de pDNA pVAX1-LacZ a 10,00 μ g/mL. Verificou-se a obtenção de um pico (Figura 29) que mostra que o criogel não liga o pDNA na sua matriz, sendo eluído logo no início. A não interação entre o plasmídeo e o suporte para ligar o pDNA, pode ser explicada pela elevada densidade de moléculas de ácido tiobarbitúrico no criogel, impedindo assim a ligação ao plasmídeo. Após a obtenção do pico inicial, injetou-se na coluna tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 com 2,50 M de NaCl para verificar que não ficou ligado algum plasmídeo que pudesse ainda eluir. A inexistência de um pico demonstra que, de facto, o suporte não ligou nenhum do pDNA, pelo que se passou para o estudo de uma matriz com o mesmo ligando a uma densidade inferior.

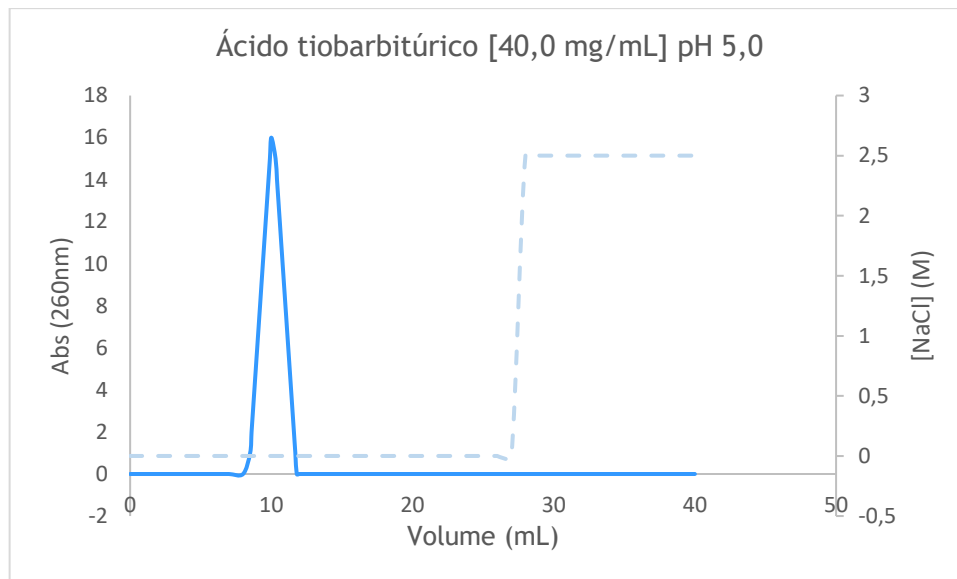


Figura 29: Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 40mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 μ L.

3.4.3.2 Ensaios cromatográficos com o criogel ácido tiobarbitúrico 10,0 mg/mL

Após o equilíbrio da matriz e a injeção de pDNA o cromatograma obtido revelou de imediato a saída de um pico que comprova a não ligação do pDNA à matriz (Figura 30). Fizem-se mais tentativas de eluição com 0,25 M, 0,50 M, 0,750 M, 1,0 M e 2,50 M mas nenhuma destas concentrações de sal promoveu a ligação do pDNA à matriz. Deste modo, realizaram-se os estudos cromatográficos na matriz com densidade inferior do mesmo ligando, e a diferentes valores de pH, para avaliar o comportamento do suporte nestas condições.

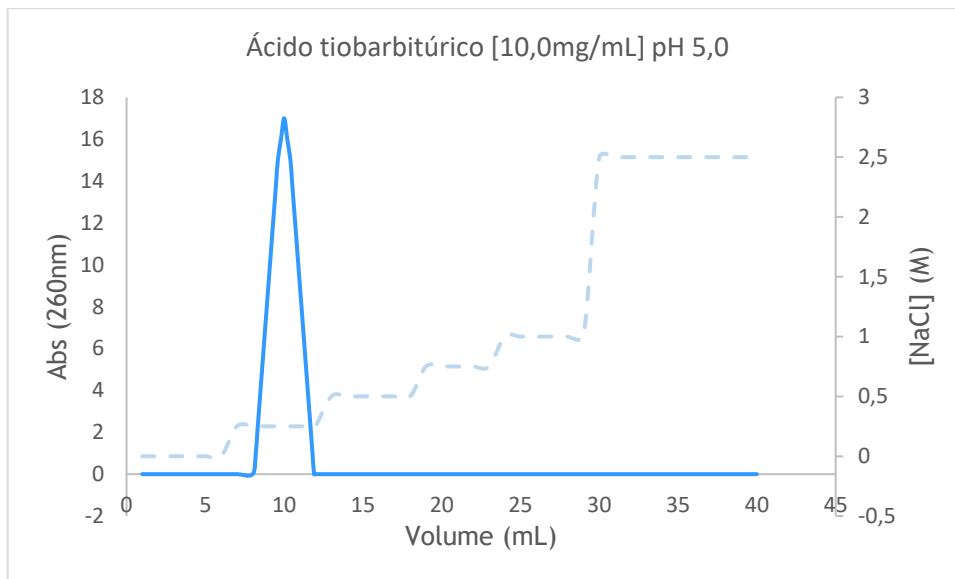


Figura 30: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 10,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com a 0,25 M, 0,50 M, 0,750 M, 1,0 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 μ L.

3.4.3.3 Ensaios cromatográficos com o criogel ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL

Pela análise dos seguintes cromatogramas (Figura 31 A a J) relativos ao suporte de ligando ácido tiobarbitúrico a 5mg/mL pode verificar-se que o pH utilizado nos estudos cromatográficos influencia em larga escala os resultados obtidos. Nos ensaio a pH 4,0 e a pH 6,0 (Figura 31 A e C) pode constatar-se que foi estabelecida uma interação entre o plasmídeo e a matriz funcionalizada pois não se observou nenhum pico visível de retenção após a injeção do DNA, o que revela que esta matriz liga o plasmídeo e o elui posteriormente com a adição de tampão com sal. Isto indica que o suporte tem efetivamente uma boa capacidade de retenção comparativamente com os criogéis de ácido tiobarbitúrico de concentrações de 40,0 e 10,0 mg/mL.

Nos ensaios realizados a pH 6,50, 7,0, 8,0 e 9,0 (Figura 31 D a G) verificou-se que a interação ente o plasmídeo e o suporte não é forte o suficiente para ligar o pDNA, o que se traduz num pico inicial após a injeção do pDNA. A aplicação de tampão acetato de sódio com 2,50 M de NaCl não promove a eluição de mais nenhum pico, o que demonstra que o suporte não ligou nenhum do pDNA, concluindo-se portanto que este pH não é favorável à ligação do DNA ao suporte.

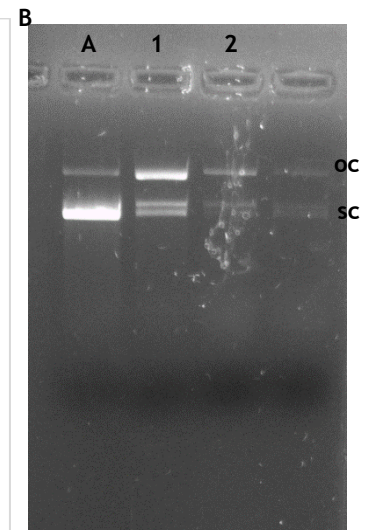
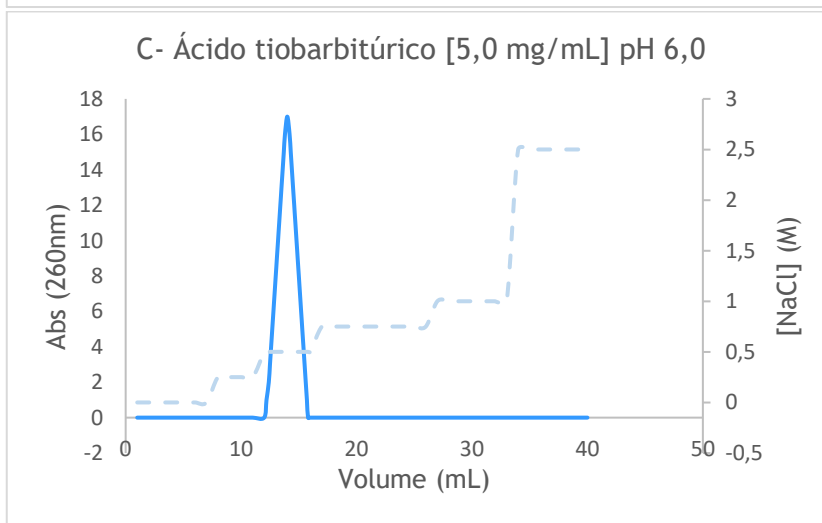
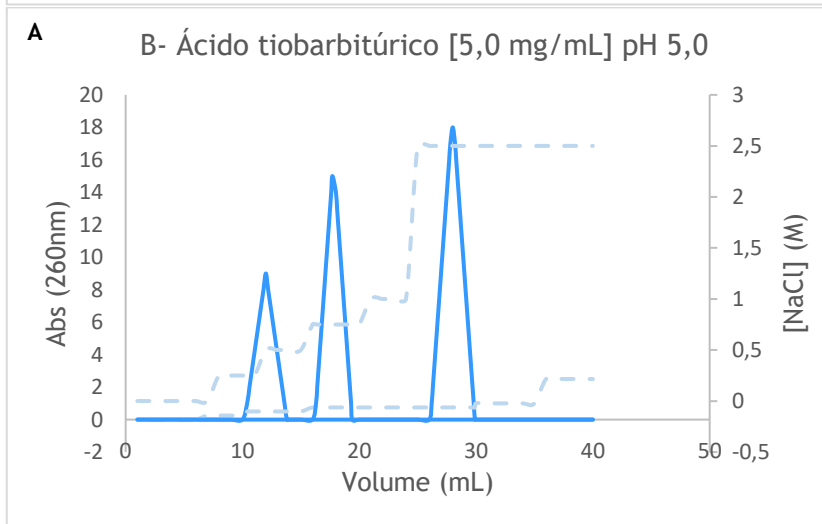
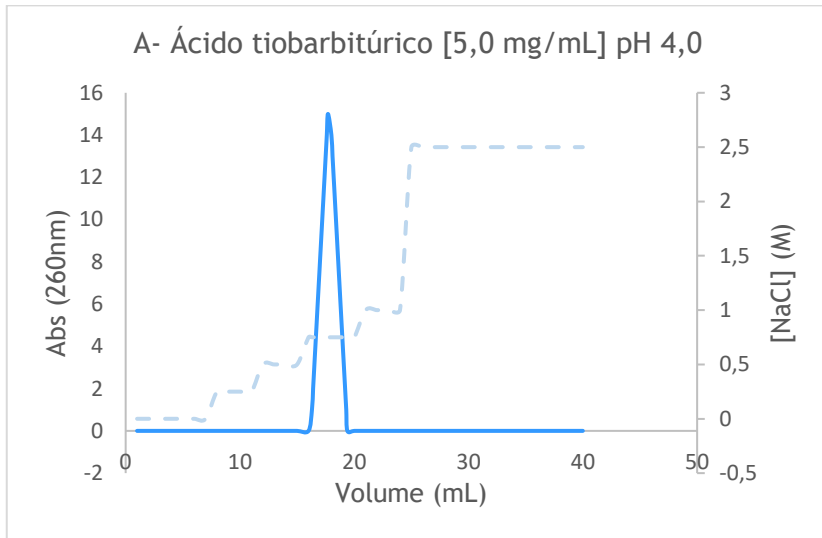
Pela análise dos cromatogramas H a J (Figura 31), correspondentes à aplicação de tampão de ligação e eluição com valores de pH de 9,5,, 10,0 e 12,0 pode verificar-se que foi estabelecida uma interação entre o plasmídeo e a matriz funcionalizada com o ligando ácido tiobarbitúrico de densidade 5,0 mg/mL, resultando assim num perfil de retenção, o que revela que esta matriz

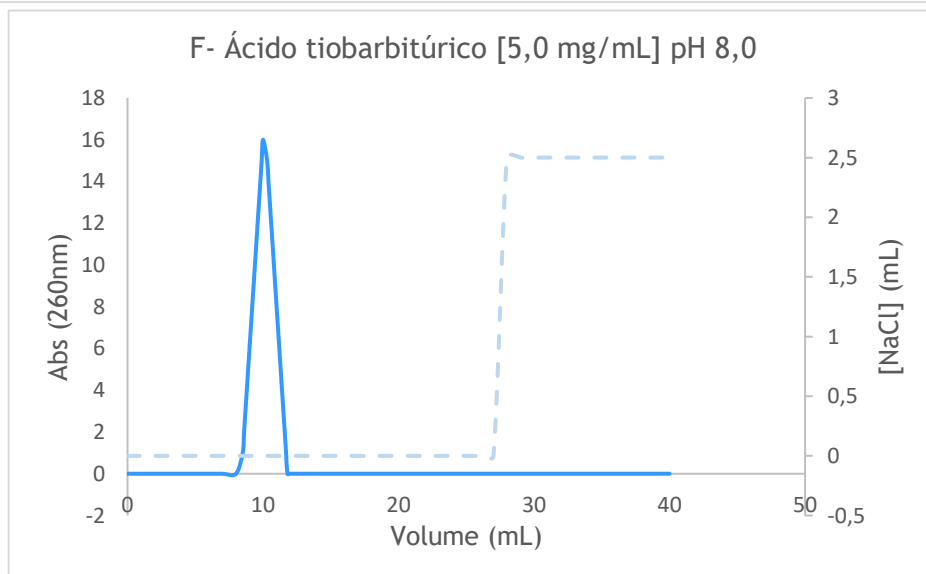
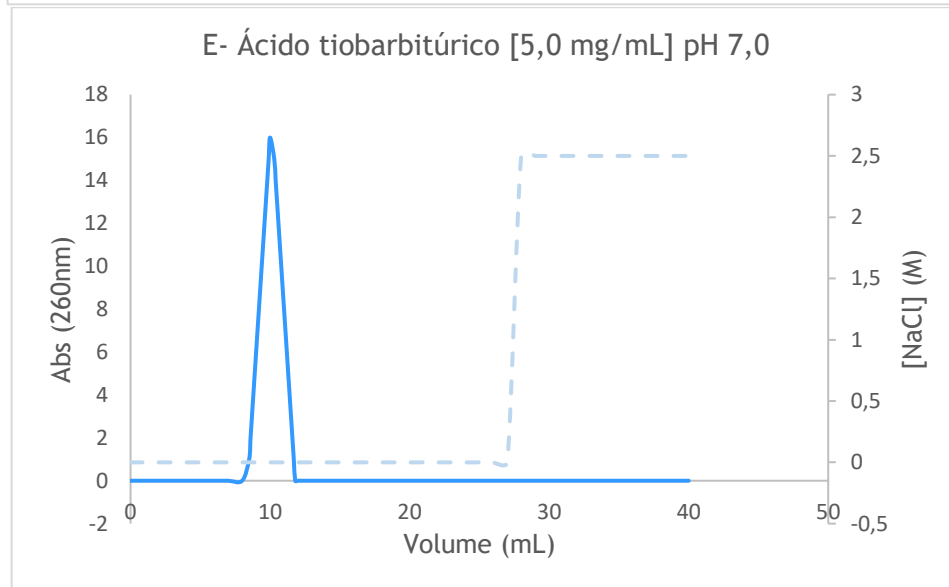
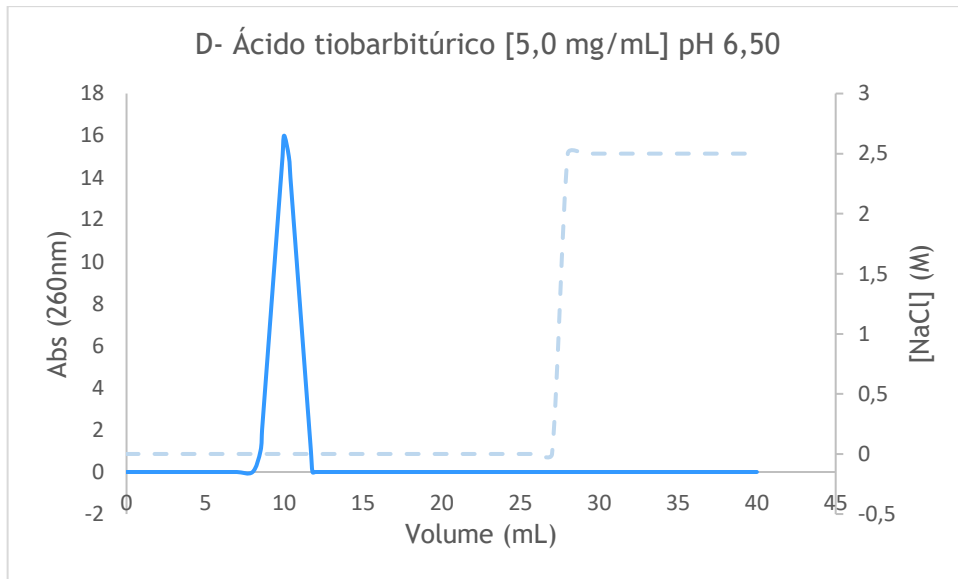
liga o plasmídeo e o elui posteriormente com a adição de tampão com sal. Isto indica que o suporte tem efetivamente uma boa capacidade de ligação aos referidos valores de pH. No entanto, mesmo após as tentativas de eluição com 0,250 M, 0,50 M, 0,750 M, 1,0 M e 2,50 M de NaCl, com estes valores de pH, o cromatograma apenas apresenta um pico, não permitindo uma eluição por passos necessária para a separação das isoformas do pDNA em picos diferentes.

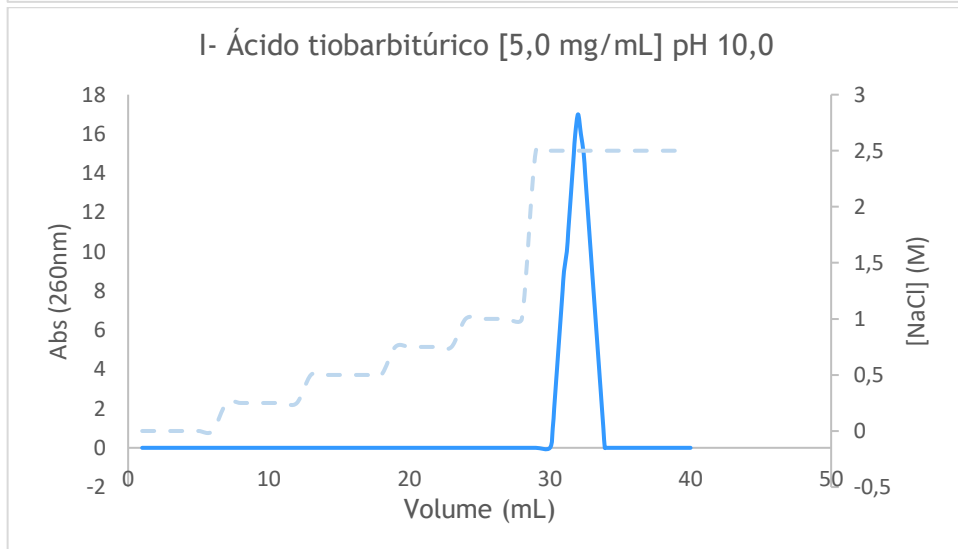
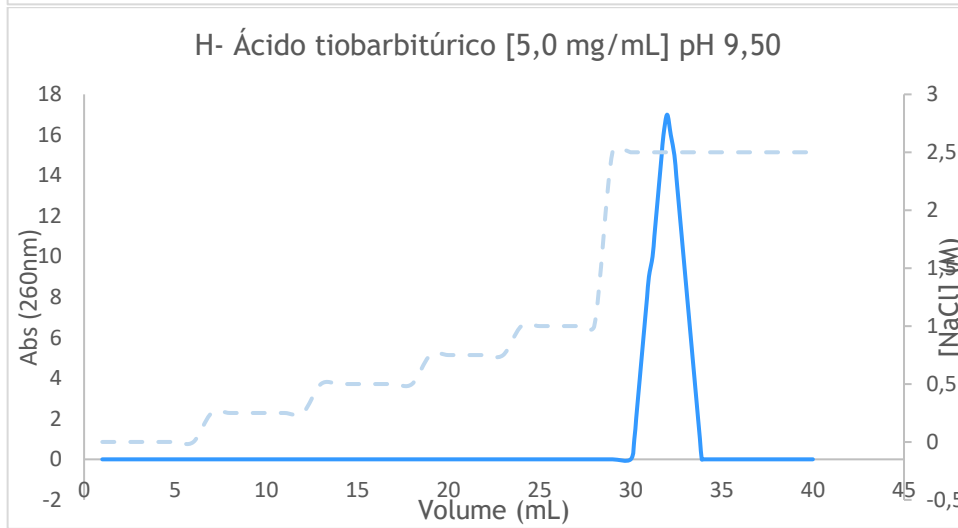
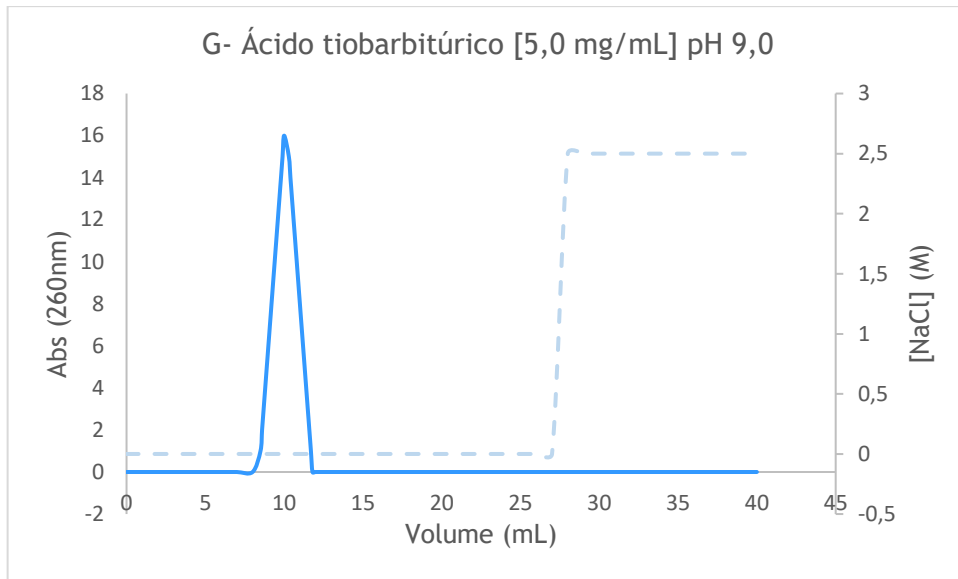
O ensaio levado a cabo a pH 5,0 (Figura 31 B) resultou num cromatograma onde se pode verificar uma interação entre o plasmídeo e a matriz funcionalizada com o ligando ácido tiobarbitúrico de densidade 5,0 mg/mL. A ausência de um pico após a injeção de pDNA revela que o pDNA liga à matriz, sendo posteriormente eluídos 3 picos com o aumento da concentração de tampão de eluição para 0,250 M, 0,50 M e 0,750 M de sal. Os picos foram recolhidos, concentrados e analisados em eletroforese em gel de 0,80 % de agarose (Figura 31 B), verificando-se que a maior quantidade de isoforma oc elui no primeiro pico, o que é um resultado positivo. Pela eletroforese pode também concluir-se que o passo intermédio de eluição é desnecessário pois o que sai no segundo pico é igual ao que sai no terceiro.

Isto indica que nas condições utilizadas, o suporte de ácido tiobarbitúrico a 5,0 mg/mL apresenta efetivamente uma boa capacidade de retenção e um bom perfil de eluição, sendo o que mostra os melhores resultados comparativamente com os criogéis de ácido tiobarbitúrico de concentrações 40,0 e 10,0 mg/mL. Isto pode ser explicado recorrendo às estruturas dos criogéis obtidas por microscopia eletrónica de varrimento, que mostram que a matriz derivatizada com 5mg/mL tem uma estrutura em esferas, que apresentam uma maior área no interior do criogel na qual a fase móvel pode passar e ligar. De facto, uma camada densa de ligandos imobilizados pode impedir o acesso do ligando aos locais de ligação do pDNA e, conseqüentemente, impedir o seu reconhecimento, levando a uma fraca retenção (Silva *et al.*, 2010,0), facto visível nestes estudos cromatográficos.

Os resultados obtidos permitem concluir também que no caso dos criogéis estudados, quanto maior a densidade de ligando, menor é a capacidade de retenção do suporte, ou seja, a presença de uma concentração elevada de ligando impede o estabelecimento das interações entre a matriz e o plasmídeo, o que é coerente com as estruturas dos criogéis obtidas por microscopia eletrónica de varrimento, que mostram que os criogéis de 10,0 e 40,0 mg/mL apresentam uma estrutura lamelar, mais restritiva para a passagem do plasmídeo.







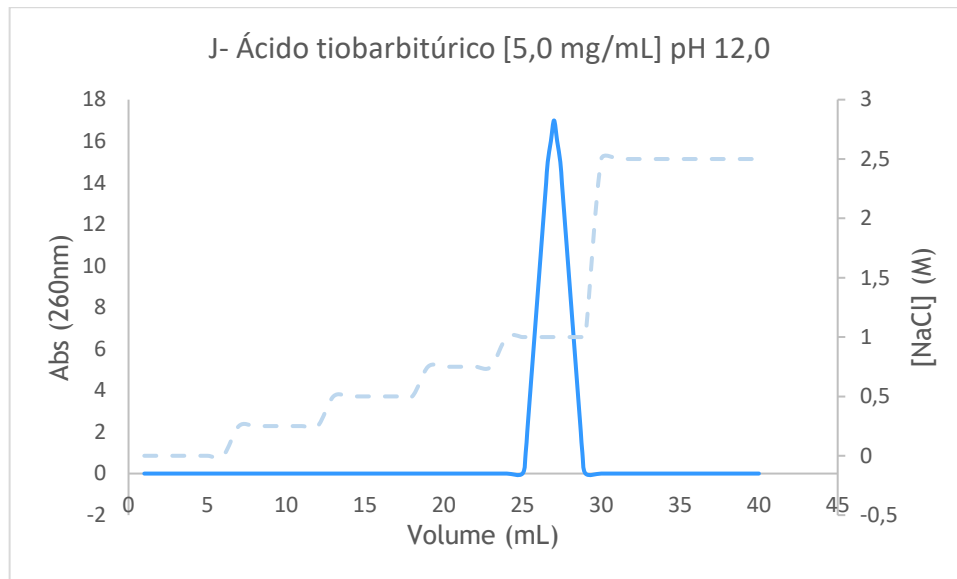


Figura 31: (A) Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH4 (A), pH 5,0 (B), pH 6,0 (C), pH 6,50 (D), pH 7,0 (E), pH 8,0 (F), pH 9,0 (G), pH 9,50 (H), pH 10,0,0 (I) e pH 12,0 (J) e a eluição com a 0,250 M, 0,50 M, 0,750 M, 1,0 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 12,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 25,0 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; linha 3: fração correspondente ao pico 3; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

3.4.4 Ensaios cromatográficos com criogel ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico

Para os ensaios de cromatografia de afinidade por FPLC com o criogel funcionalizado com ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico, foram usadas três concentrações distintas de ligando (40, 10,0 e 5,0 mg/mL). A coluna com o criogel foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e foram injetadas as isoformas purificadas pVAX1-LacZ, seguindo-se os passos de eluição descritos no ponto 3.7.3.

3.4.4.1 Ensaios cromatográficos com o criogel ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 40 mg/mL

A coluna de criogel funcionalizada com 40,0 mg/mL de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e injetados 10,00 μ L de pDNA pVAX1-LacZ a 10,00 μ g/mL. Verificou-se a obtenção de um pico logo no início (Figura 32) que mostra que o criogel não liga o pDNA à sua matriz, sendo este eluído logo no início, o que demonstra que a interação entre o plasmídeo e o suporte não é suficientemente forte. Este facto pode ser explicado pela elevada densidade de moléculas de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico no criogel,

impedindo assim a ligação ao plasmídeo. Após a obtenção deste pico injetou-se na coluna tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 com 2,50 M de NaCl e verificou-se que não elui mais plasmídeo. Pode concluir-se que este suporte não liga o pDNA na sua matriz, sendo por isso excluída a sua utilização nos estudos cromatográficos.

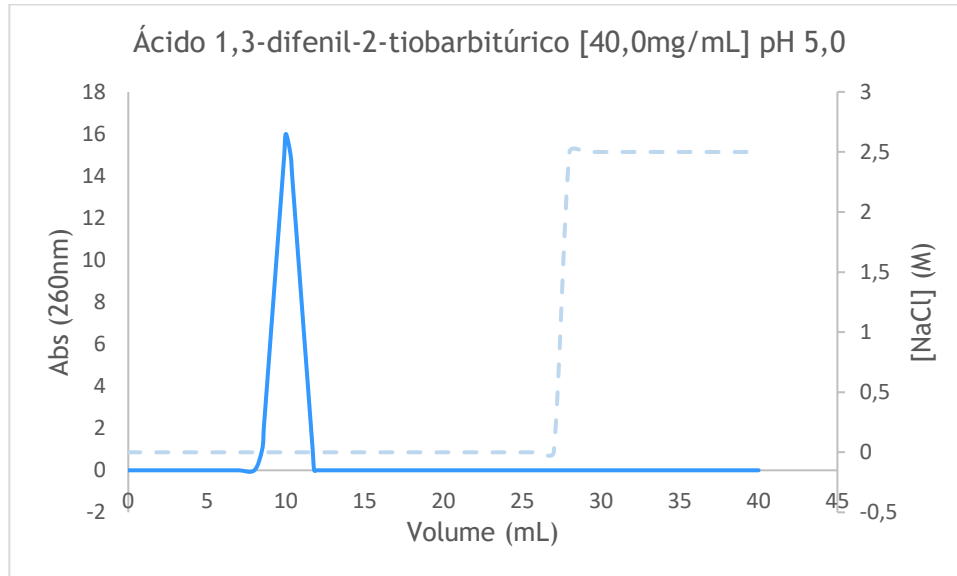


Figura 32: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 40,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,0 μ L.

3.4.4.2 Ensaio cromatográfico com o criogel ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 10,0 mg/mL

O criogel funcionalizado com 10,0 mg/mL de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico foi avaliado para dois valores diferentes de pH: 5,0 e 7,0. Pela análise dos cromatogramas (Figura 33 A e B) pode verificar-se que a pH 7 esta matriz não liga o pDNA, pois este é eluído todo aquando da sua injeção. Ao utilizar o pH 5,0 observa-se que o suporte liga o pDNA, que elui posteriormente com a utilização de 0,5M de NaCl. No entanto, apesar da ampla gama de concentrações de sal aplicadas (0,25 M, 0,50 M, 0,75 M, 1,0 M e 2,50 M) apenas se obteve a eluição de um único pico o que não permite separar as duas isoformas de pDNA.

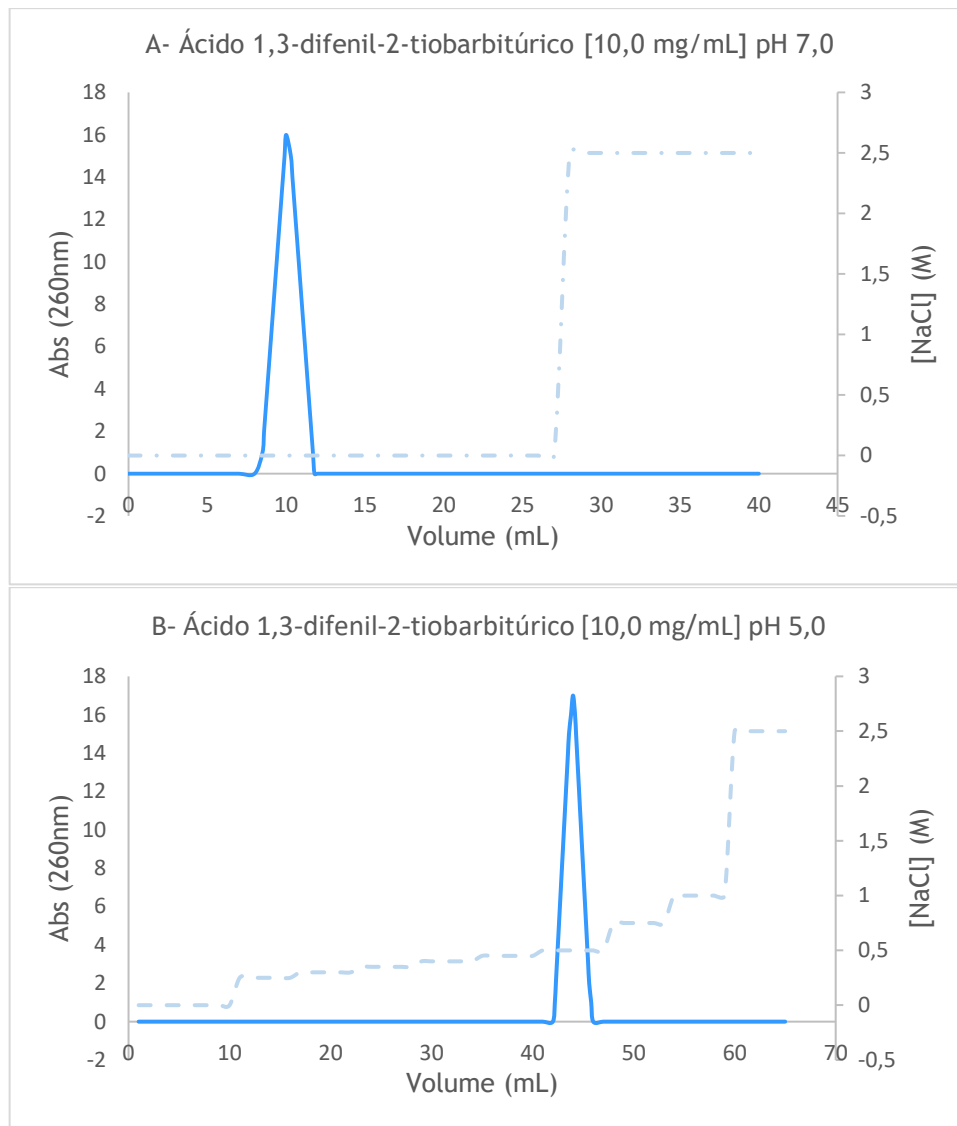


Figura 33: Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 10,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 7 (Figura 45 A) e pH 5,0 (Figura 45 B) e a eluição com a 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 7 (Figura 45A) e a 0,250 M, 0,50 M, 0,750 M, 1,0 M e 2,50 M (Figura 45 B), como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 μ L.

3.4.4.3 Ensaios cromatográficos com o criogel ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 5,0 mg/mL

Ao efetuar um estudo com o criogel funcionalizado com 10,0 mg/mL de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico a dois valores de pH diferentes pode verificar-se que a pH 7,0 grande parte do plasmídeo é eluído logo aquando a sua injeção (Figura 34 A). Ao aplicar uma concentração de 2,50 M de sal observa-se a eluição de um pequeno pico que comprova uma baixa capacidade de retenção do suporte, que apenas ligou uma pequena parte de pDNA, mas que demonstra que a interação entre o plasmídeo e o suporte não é forte o suficiente.

A pH 5,0 o suporte liga todo o pDNA que elui posteriormente num único pico com a aplicação de 0,75M de NaCl (Figura 43 B).

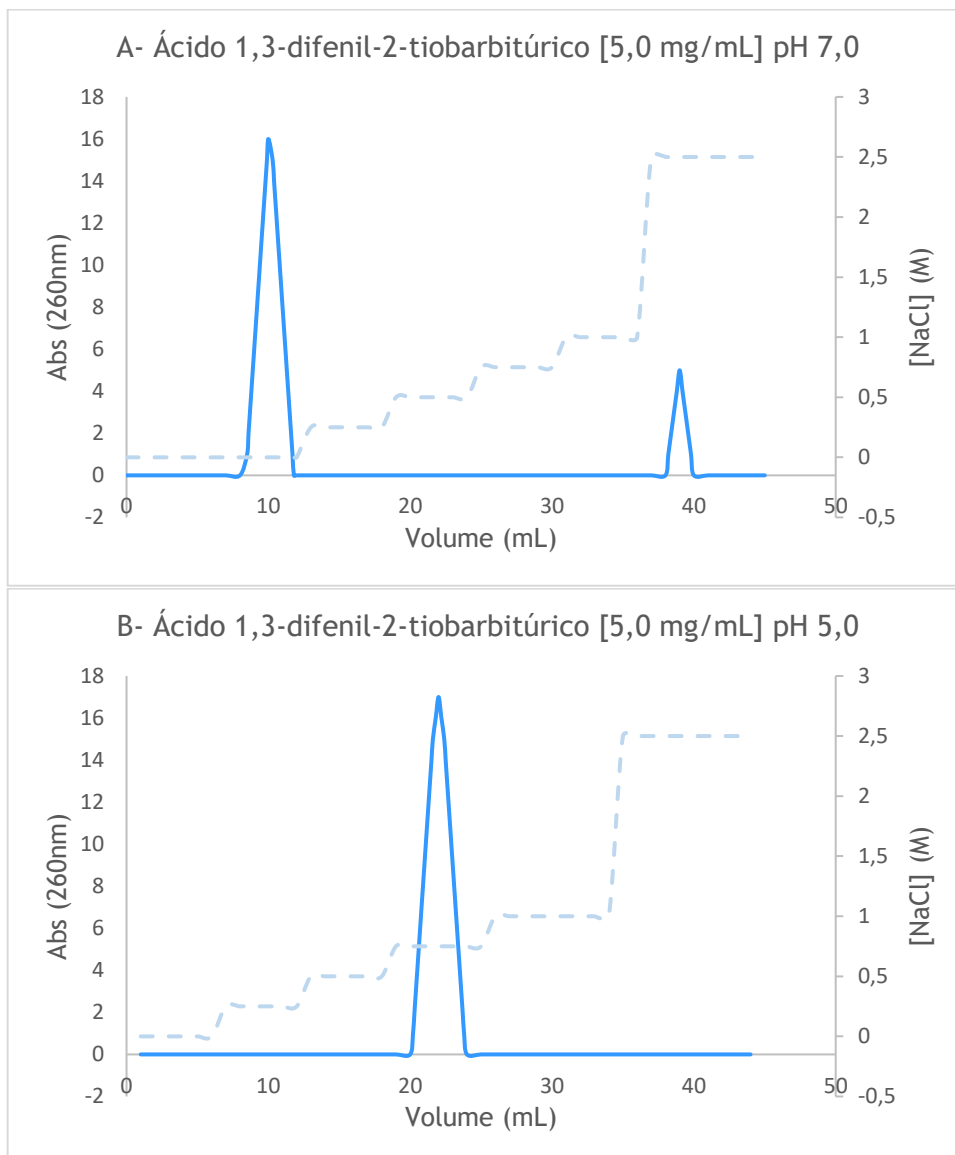


Figura 34: Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 7 (Figura 44 A) e pH 5,0 (Figura 44 B) e a eluição com por passos a 0,25 M, 0,50 M, 0,750 M, 1,0 M e 2,50 M em ambos os casos, de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 7 (Figura 44 A) e pH 5,0 Figura 44 B), como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 μ L.

A obtenção de um bom perfil de ligação nos estudos de pH com a coluna de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico remetem para o potencial deste suporte, para estudos de separação de isoformas, motivo pelo qual as condições de eluição foram exploradas com maior detalhe.

Os estudos foram levados a cabo, verificando-se total retenção do pDNA na ausência de sal, como se pode observar pelo cromatograma da Figura 35, tendo sido eluídos dois picos de intensidades diferentes, com o objetivo de separar as diferentes isoformas. A eluição do

primeiro pico foi conseguida com a presença de NaCl a 0,510 M, e a do segundo pico a 2,50 M e, como se pode visualizar pela eletroforese, não se conseguiram separar totalmente ambas as isoformas, mas vê-se claramente uma maior predominância de oc pDNA no primeiro pico e de sc pDNA no segundo, o que é um bom ponto de partida para otimizações posteriores.

Seguidamente foram testadas diferentes condições com o objetivo de promover a separação das isoformas.

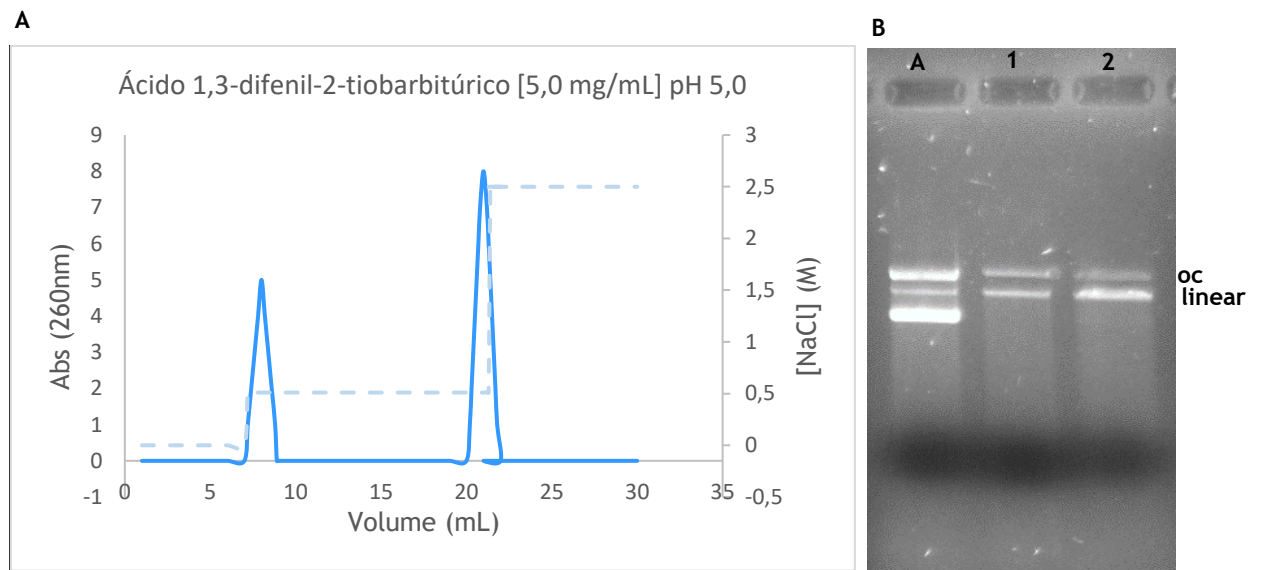


Figura 35: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,250 M, 0,510 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Por este motivo aumentou-se ligeiramente a concentração de sal no tampão de eluição do primeiro pico para 0,520 M de NaCl, experimentou-se a utilização de um passo intermédio a 0,750 M de NaCl e aplicou-se um último passo de eluição a 2,50 M (Figura 36). A boa capacidade de ligação do suporte manteve-se, e a quantidade de sc pDNA no segundo pico do cromatograma aumentou bastante, o que é um aspeto positivo. A isoforma linear do DNA que se vê na eletroforese é devida a degradação, possivelmente devido à temperatura.

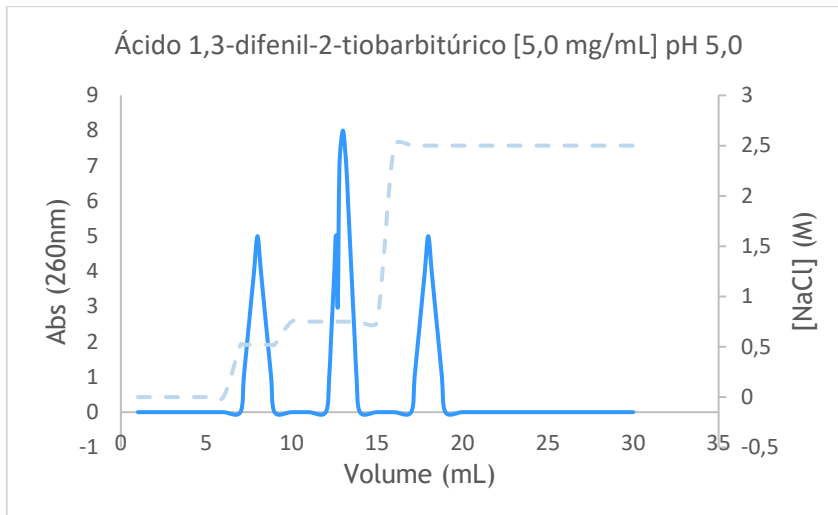
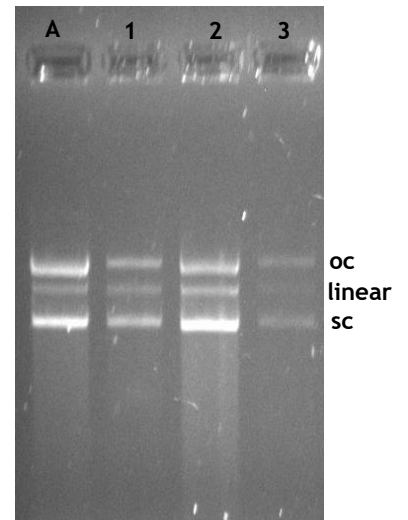
A**B**

Figura 36: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,250 M, 0,520 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; linha 3: fração correspondente ao pico 3. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

No sentido de se otimizar a separação das isoformas foram testadas novas concentrações de sal no eluente. Deste modo, a coluna foi equilibrada e após injeção da amostra de DNA, efetuou-se uma estratégia de eluição em três passos com 0,520 M, 0,750 M e 2,50 M de NaCl, tendo-se obtido o cromatograma da Figura 37. Os três picos foram recolhidos e concentrados para análise por eletroforese em gel de agarose. Como se pode verificar pela eletroforese da Figura 44, não se conseguiram ainda separar as isoformas do DNA. No entanto, verificou-se que a isoforma oc aparece maioritariamente no primeiro pico, enquanto que a isoforma sc é eluída principalmente no pico 3. Estes resultados sugerem a eliminação do passo intermédio de 0,750 M de sal.

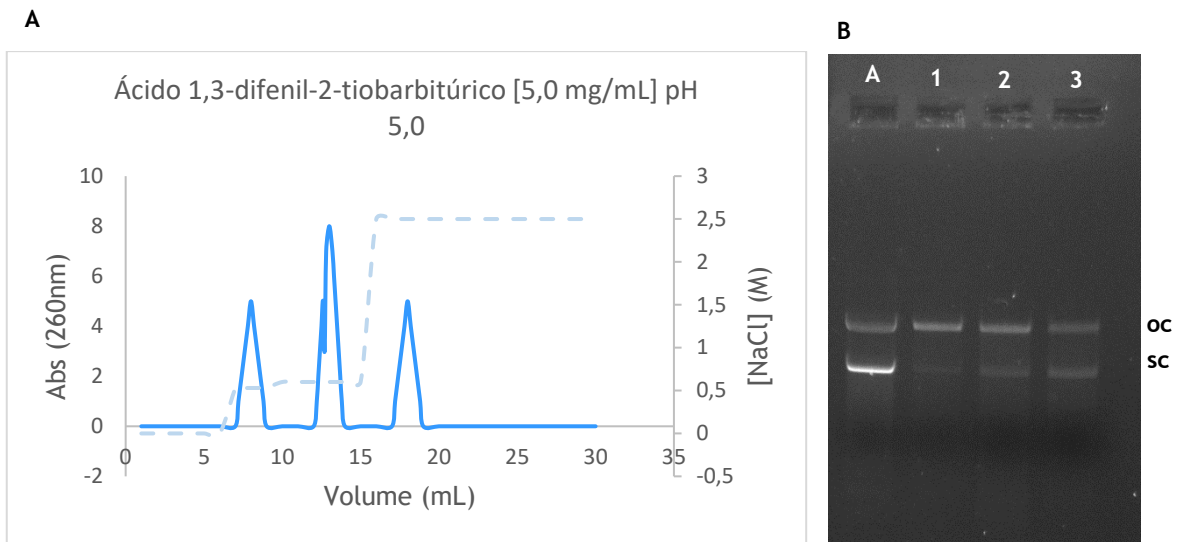


Figura 37: (A) Perfil cromatográfico de amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,52 M, 0,75 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,0 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; linha 3: fração correspondente ao pico 3. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Como se pode visualizar pela eletroforese da Figura 38, embora não se tenham conseguido separar as isoformas do pDNA, pôde observar-se um aumento da isoforma sc no segundo pico. Deste modo foi eliminado o passo intermédio. A coluna de criogel com ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e foram injetados 10,00 μ L de pDNA pVAX1-LacZ a 10,00 μ g/mL, sendo o primeiro pico eluído a 0,53 M e o segundo a 2,50 M de NaCl, o que deu origem a um bom rendimento de sc pDNA no segundo pico, embora ainda com alguma quantidade de oc pDNA. Deste modo, foi aumentada a concentração de sal para 0,530 M com o intuito de eluir maior quantidade da isoforma oc no primeiro pico e diminuir no segundo.

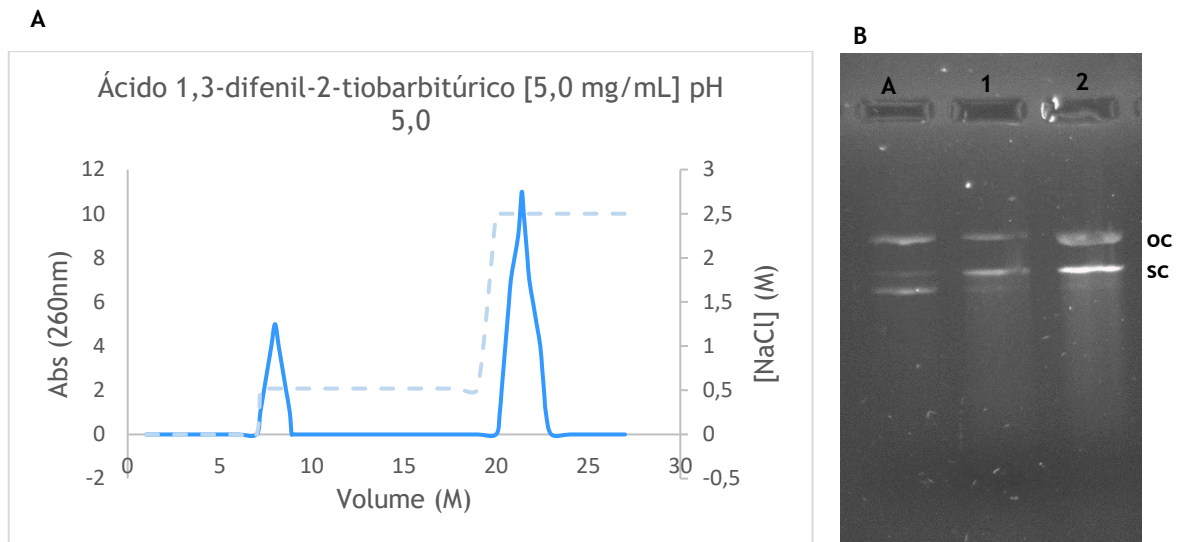


Figura 38: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,53 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,000 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA;

Assim, e para cumprir o objetivo de eluir mais isoforma oc no primeiro pico e sc no segundo pico, aumentou-se um pouco a concentração de eluição do primeiro pico. Neste sentido, e após o equilíbrio, injeção de pDNA e obtenção de ligação do DNA à matriz, a concentração de sal utilizada no primeiro passo foi aumentada para 0,540 M e a do segundo pico mantida a 2,50 M de NaCl. Nestas condições obteve-se uma maior seletividade, apresentando o segundo pico mais sc pDNA que o primeiro (Figura 39).

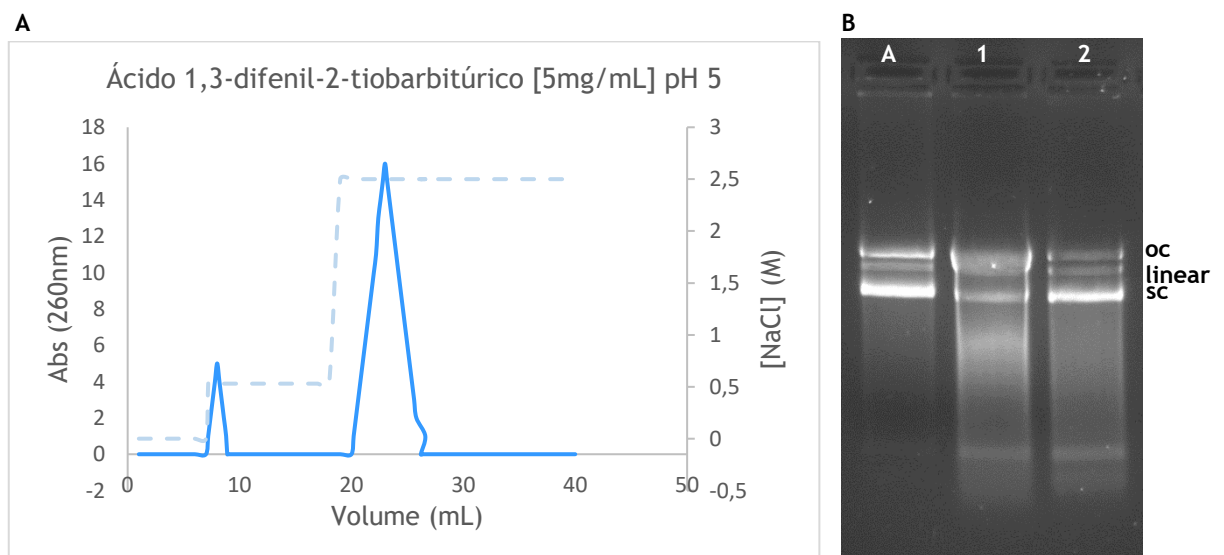


Figura 39: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,540 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,000 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

De seguida, as condições foram otimizadas e a eluição do primeiro pico foi conseguida com a presença de NaCl a 0,545 M, e a do segundo pico a 2,50 M. Como se pode verificar pela eletroforese (Figura 40), não se conseguiram separar totalmente as isoformas do pDNA. Verificou-se no entanto alguma seletividade, sendo que o segundo pico é o único que apresenta a isoforma sc do pDNA apenas com uma pequena quantidade das outras isoformas.

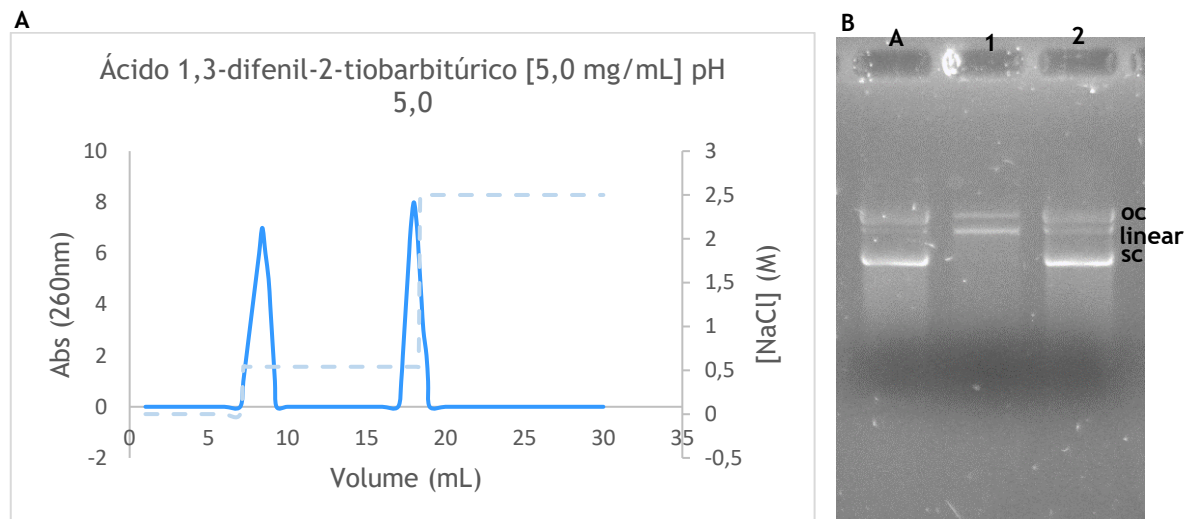


Figura 40: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,545M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,000 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Deste modo, aumentou-se a concentração de sal no eluente para 0,550 M com o objetivo de diminuir a concentração da isoforma oc no segundo pico, com a concentração de 2,50 M de NaCl, obtendo-se o cromatograma e respetiva eletroforese, representados na Figura 41. Pode assim observar-se uma boa seletividade do suporte nestas condições, que elui quase a totalidade do oc pDNA do primeiro pico, aparecendo o sc pDNA praticamente purificado no segundo pico.

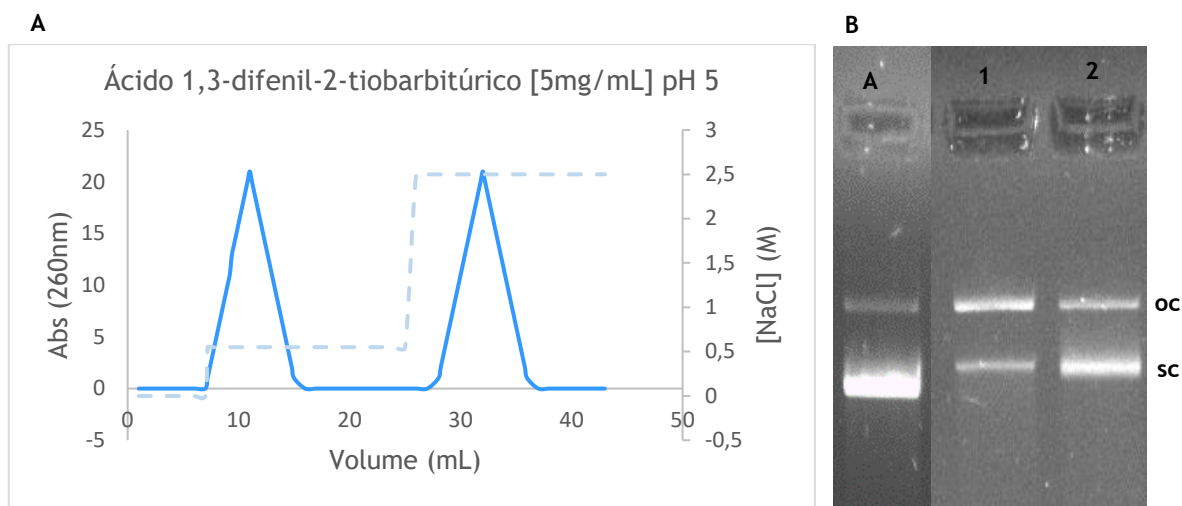


Figura 41: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,550 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA;

Para verificar a possibilidade de otimização destas condições, foi efetuada uma estratégia de eluição por dois passos com uma concentração no primeiro passo de 0,560 M, 0,570 M e 0,580 M de NaCl. Os resultados apresentam-se nas Figuras 42 a 44.

Nestas estratégias de eluição por dois passos, mantém-se o perfil de ligação ao suporte mas, no caso da eluição aparenta haver uma regressão da separação anteriormente conseguida, uma vez que, com o primeiro passo a 0,56 M (Figura 42) o sc pDNA passa do segundo para o primeiro pico, misturando-se com o oc presente no pico. Na eluição com 0,570 M, no primeiro pico (Figura 43) o oc pDNA é eluído também no segundo pico que passa a ter uma mistura de isoformas. Na eluição com 0,580 M de NaCl, no primeiro pico (Figura 44) diminui bastante o rendimento da isoforma superenrolada no segundo pico.

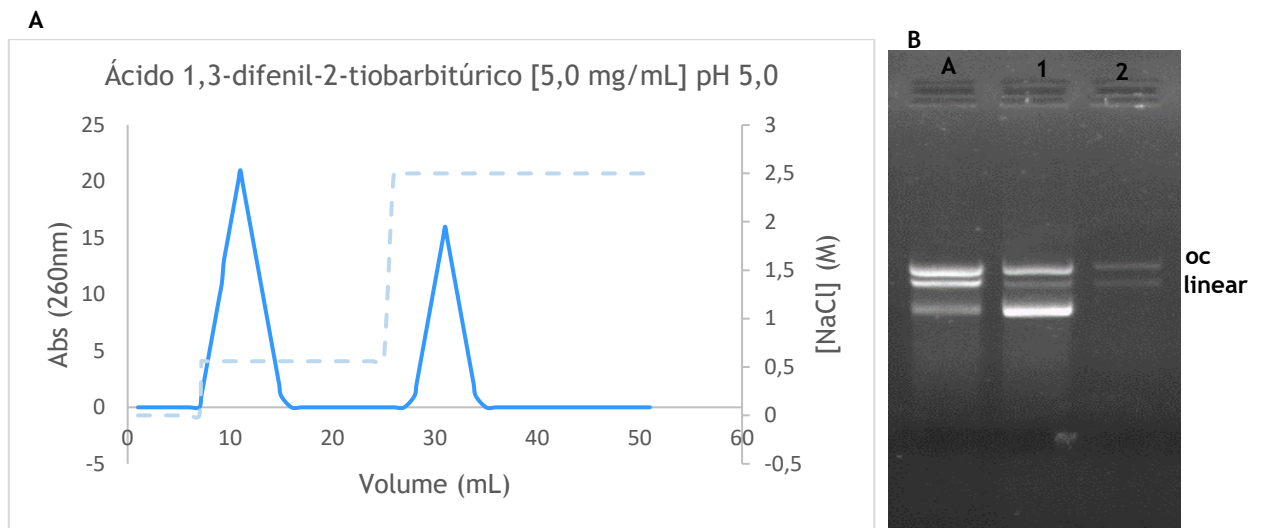


Figura 42: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,250 M, 0,50 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,0 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

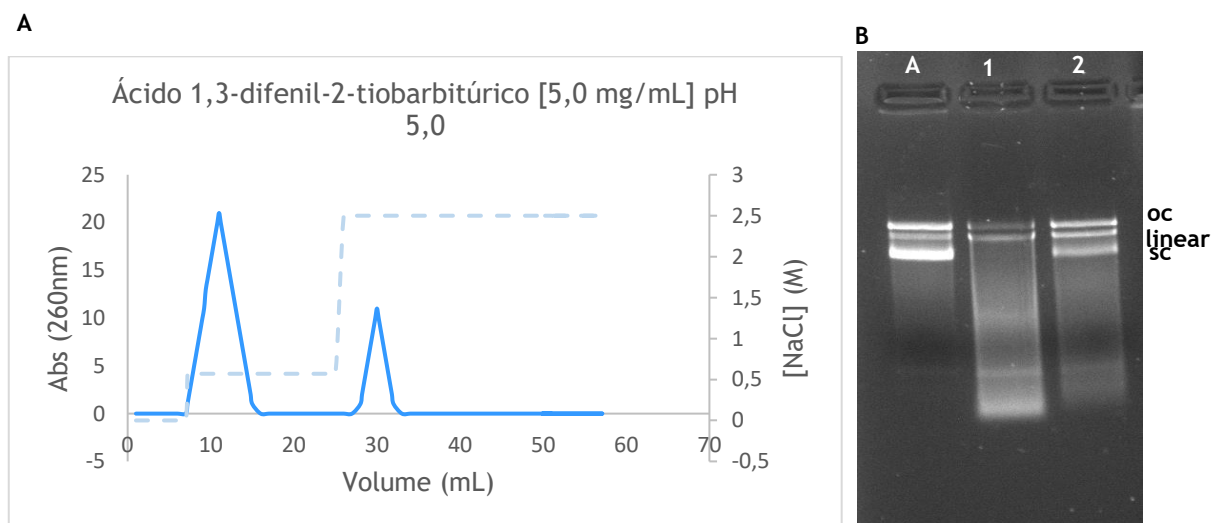


Figura 43: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,250 M, 0,50 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,0 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

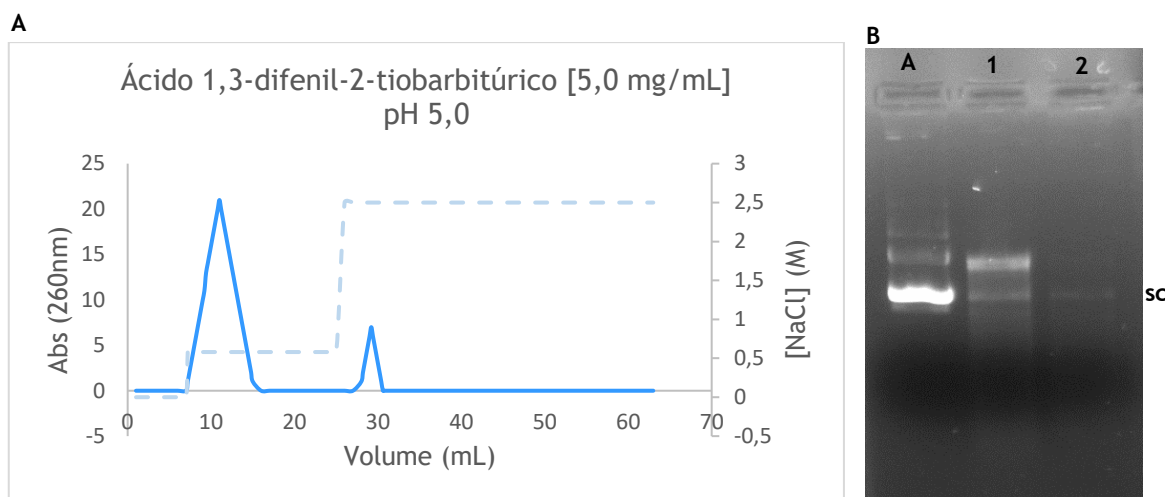


Figura 44: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de pVAX1-LacZ injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,250 M, 0,50 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra pré-purificada injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear. oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Após várias tentativas de otimização dos passos de eluição não se conseguiu obter a separação total de ambas as isoformas. No entanto é de notar que o suporte de criogel ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 5,0 mg/mL apresenta seletividade para as isoformas, uma vez que a isoforma sc é eluída apenas no pico 2, apesar de conter também uma pequena quantidade da isoforma oc.

A eluição da isoforma oc no primeiro pico foi conseguida com tampão acetato com 0,550 M de NaCl, como se pode verificar pela eletroforese realizada (Figura 44), enquanto a isoforma sc ficou eluída no segundo pico aumentando a concentração de NaCl para 2,50 M. A respetiva eletroforese mostra a presença de uma grande quantidade da isoforma sc e uma banda vestigial correspondendo à isoforma oc.

O suporte de controlo não derivatizado não promoveu qualquer retenção de pDNA, o que comprova a especificidade do ligando ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico para o pDNA, sendo as interações estabelecidas unicamente por parte do ligando e não pela matriz cromatográfica.

Ao longo destes ensaios, pode concluir-se que concentrações mais baixas de ligando no criogel melhoram a retenção do plasmídeo. Estes resultados estão de acordo com os resultados das estruturas dos criogéis obtidas por microscopia eletrónica de varrimento, que mostram que a matriz derivatizada com 5mg/mL tem uma estrutura em esferas, com maior área de superfície que permite a obtenção de melhores perfis de retenção e eluição, relativamente aos criogéis de 10,0 e 40,0 mg/mL que apresentam uma estrutura lamelar, mais restritiva para a passagem do plasmídeo.

Os resultados dos estudos de pH revelaram também que o pH 5,0 é o mais eficaz, tendo sido portanto o utilizado em ensaios posteriores.

Como o criogel de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 5,0 mg/mL foi o que apresentou melhores capacidades de retenção do pDNA e melhores resultados de separação de isoformas foi utilizado nos ensaios cromatográficos num sistema ÄKTA Purifier de modo a avaliar a sua especificidade para as diferentes isoformas do plasmídeo NTC 7482-41H-VA2 HA que codifica o gene da hemaglutinina, o maior antígeno do vírus Influenza.

3.5. Ensaios cromatográficos no sistema ÄKTA Purifier

3.5.1 Ensaios cromatográficos com criogel ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 5,0 mg/mL

O criogel poli (HEMA-GMA) funcionalizado com 5,0 mg/mL de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico foi utilizado em ensaios cromatográficos num sistema ÄKTA Purifier de modo a avaliar a sua especificidade para as diferentes isoformas da vacina de DNA contra o influenza (plasmídeo NTC 7482-41H-VA2 HA) e otimizar o seu perfil de eluição.

3.5.1.1. Separação da isoforma superenrolada da amostra pré-purificada de NTC 7482-41H-VA2 HA

Depois de aplicada na separação das isoformas do pVAX1-LacZ, a coluna de criogel com ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0mM pH 5,0 e foram injetados 10,00 µL de pDNA NTC 7482-41H-VA2 HA com a concentração de 10,0 µg/mL, verificando-se total retenção do pDNA na ausência de sal. Como se pode observar pelo cromatograma da Figura 45, foram eluídos dois picos de intensidades diferentes, com o objetivo de separar as diferentes isoformas, obtendo-se a eluição do primeiro pico com NaCl a 0,20 M, e a do segundo pico a 2,50 M do mesmo sal. A eletroforese em gel de agarose (Figura 45) mostra que não se conseguiram separar as isoformas do pDNA, mas obteve-se alguma seletividade com maior quantidade de oc pDNA no primeiro pico e de sc pDNA no segundo pico.

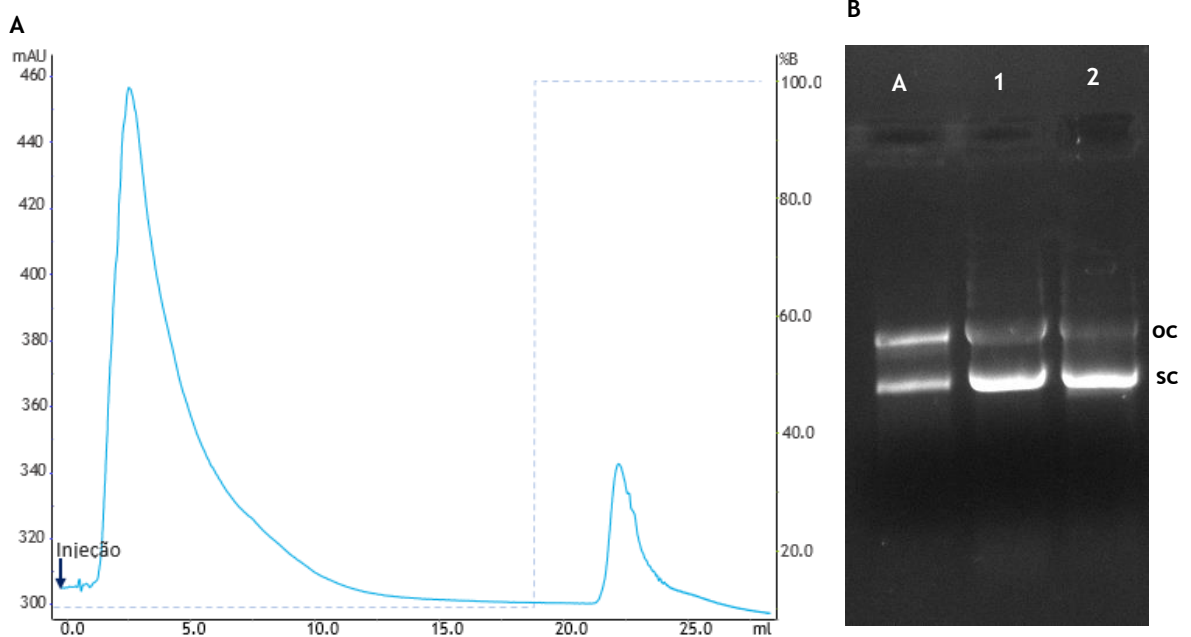


Figura 45: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de NTC 7482-41H-VA2 HA injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,20M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

No sentido de tentar que a isoforma sc fosse eluída apenas no segundo pico, utilizou-se uma menor concentração de sal (0,050 M) no primeiro pico e 2,0 M no segundo. Conseguiu isolar-se deste modo a isoforma superenrolada do pDNA, mas com um rendimento muito abaixo do pretendido (Figura 46).

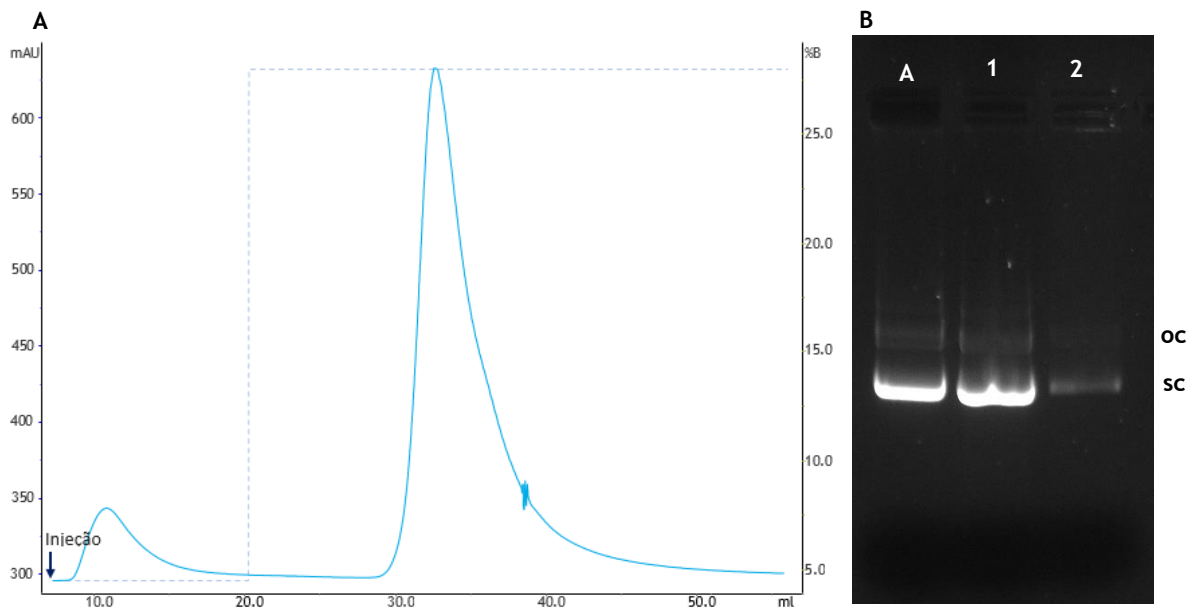


Figura 46: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,050 M e 2,0 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,0 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

A coluna de criogel com ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico foi equilibrada com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e foram injetados 10,0 μ L de pDNA NTC 7482-41H-VA2 HA a 10,00 μ g/mL verificando-se a total retenção do pDNA na ausência de sal, tendo sido eluídos dois picos de intensidades diferentes, com o objetivo de separar as diferentes isoformas: o primeiro com a presença de NaCl a 1,0 M, e a do segundo pico a 2,50 M e, como se pode visualizar pela eletroforese em gel de agarose (Figura 47 B), conseguiu separar-se totalmente a isoforma superenrolada do pDNA, já com maior rendimento.

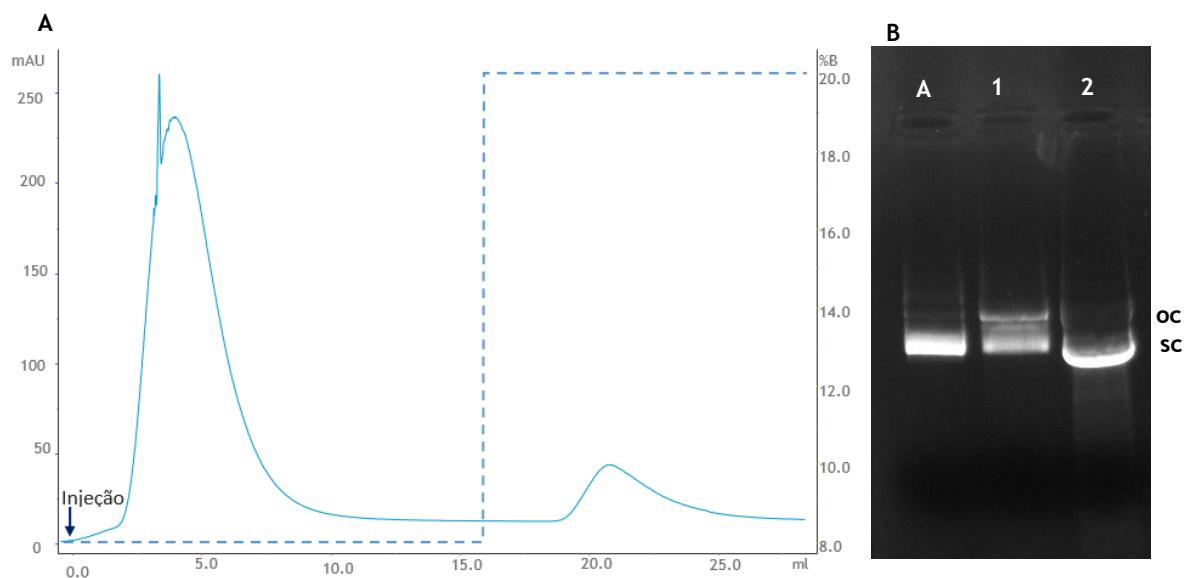


Figura 47: Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de NTC 7482-41H-VA2 Hainjetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 1,0 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Com o objetivo de aumentar o rendimento da separação de isoformas o suporte foi testada a eluição em dois passos, primeiro na presença de NaCl a 0,550 M, e depois com 2,0 M do mesmo sal e, como se pode visualizar pela eletroforese em gel de agarose (Figura 48), conseguiu-se separar a isoforma sc do pDNA, já com maior rendimento e de forma mais nítida, relativamente ao ensaio anterior.

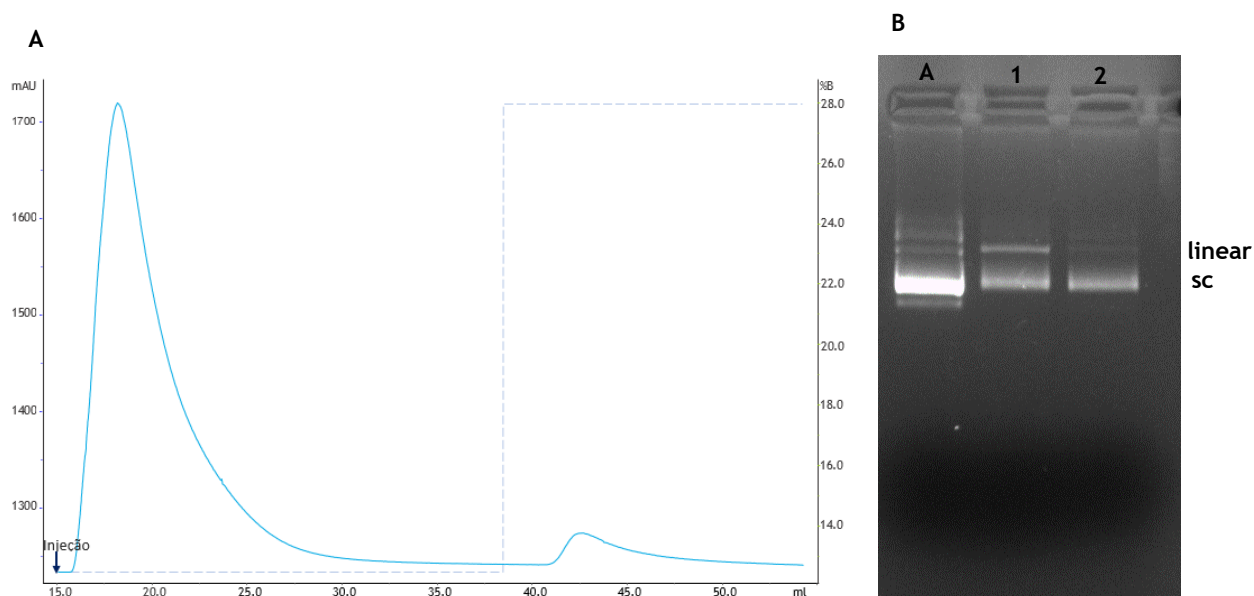


Figura 48: (A) Perfil cromatográfico da amostra pré-purificada de NTC 7482-41H-VA2 HA injetada na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,550 M e 1,0 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,0 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

3.5.1.2. Separação da isoformas superenrolada do lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA

Após a otimização da separação das isoformas do pDNA NTC 7482-41H-VA2 HA utilizando o criogel derivatizado com ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico, este foi depois testado na purificação do plasmídeo a partir de uma lisado clarificado contendo ainda um elevado grau de impurezas como RNA e proteínas. O suporte foi equilibrado com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH5 e foram injetados 500 μ L de amostra de lisado com a concentração de 10,0 μ g/mL verificando-se total retenção do pDNA na ausência de sal (Figura 49). De seguida, foram eluídos dois picos de intensidades diferentes, com o objetivo de separar ambas as isoformas: o primeiro na presença de NaCl 0,170 M, e o segundo a 2,50 M do mesmo sal. Como se pode visualizar pela electroforese em gel de agarose, o RNA é eliminado todo no primeiro pico, bem como a maior parte do oc pDNA. Esta estratégia de eluição tem no entanto baixa eficácia porque há muita perda de sc DNA que deveria sair no segundo pico e sai praticamente também todo no primeiro.

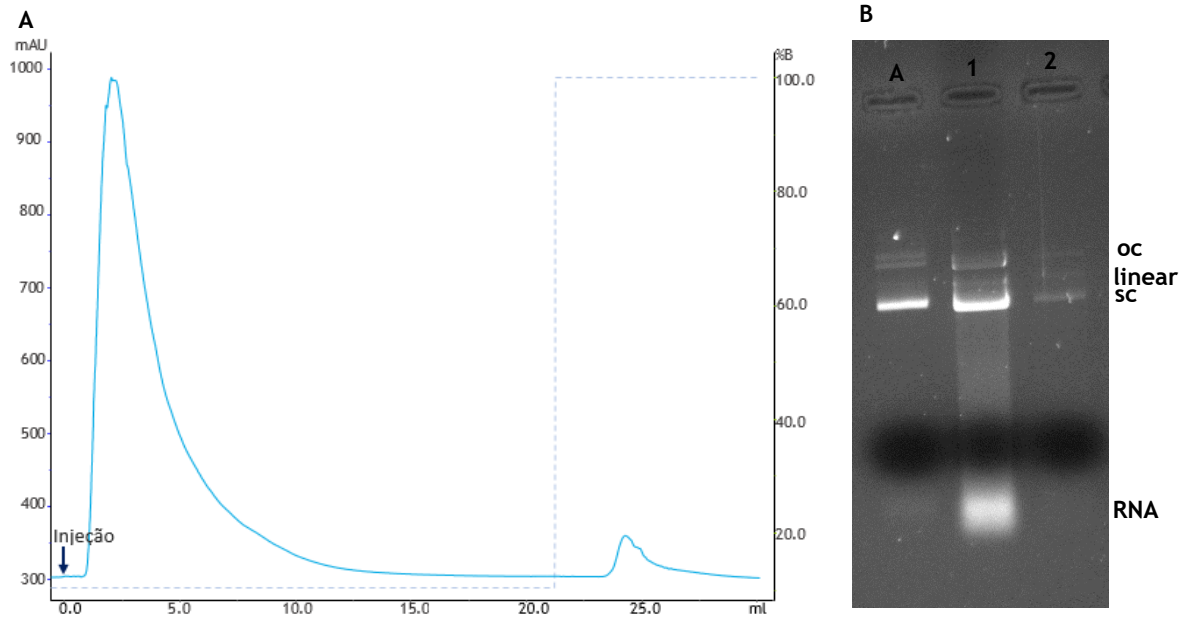


Figura 49: (A) Perfil cromatográfico de lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,170 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 500,0 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Deste modo, diminuiu-se a concentração do eluente para 0,163 com o intuito de não eluir a isoforma sc no primeiro pico, tendo-se obtido os seguintes resultados (Figura 50).

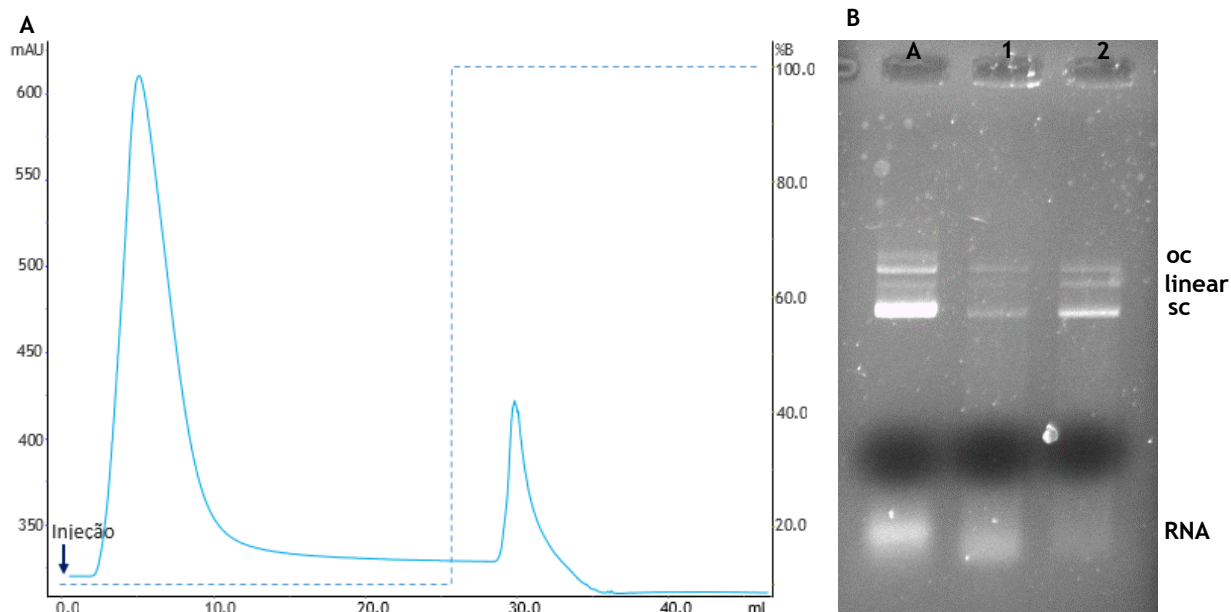


Figura 50: (A) Perfil cromatográfico de lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,163 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 500,0 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Como se pode visualizar pela eletroforese em gel de agarose, conseguiu-se que a isoforma superenrolada do pDNA fosse eluída quase toda no segundo pico, mas este ainda tem também grande quantidade de oc pDNA, pelo que foi testado o eluente com um ligeiro incremento na concentração de sal para 0,168 M de modo a que, tanto a isoforma oc como o RNA fossem eluídos maioritariamente no primeiro pico o que foi conseguido, embora com alguma perda de sc pDNA (Figura 51).

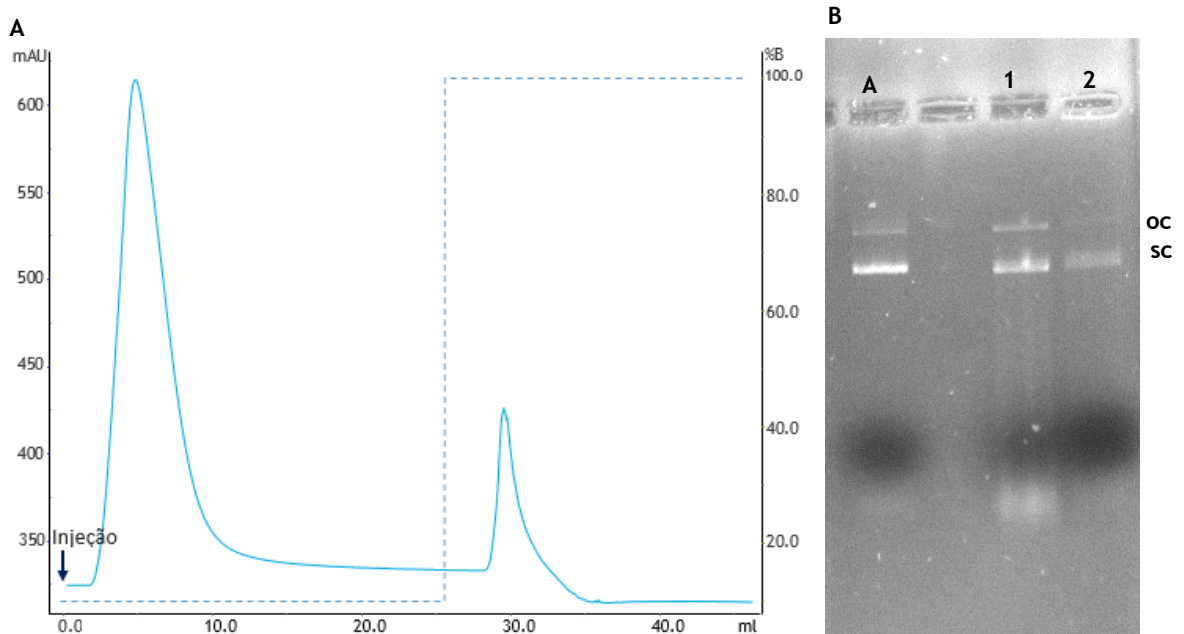


Figura 51: (A) Perfil cromatográfico de lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,168 M e 2,250 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 500,0 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA.

Seguidamente foi testada uma nova estratégia com diferente concentração de sal e também com a injeção de maior volume de amostra (500 μ L) de lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA a 10,00 μ g/mL. O criogel foi equilibrado com tampão acetato de sódio 10,0mM pH5 e após a injeção da amostra verificou-se a total retenção do pDNA na ausência de sal. A eluição por passos utilizando tampão com NaCl a 0,263 M e 2,50 M promoveu respetivamente a eluição de dois picos de intensidades diferentes, em que no primeiro se obteve a isoforma oc e o RNA e no segundo a isoforma sc. Como se pode visualizar pela eletroforese em gel de agarose (Figura 52 B), conseguiu-se separar a isoforma superenrolada do pDNA, já praticamente sem contaminação visível, pelo que a amostra foi recolhida do pico 2, concentrada e utilizada para os ensaios de quantificação.

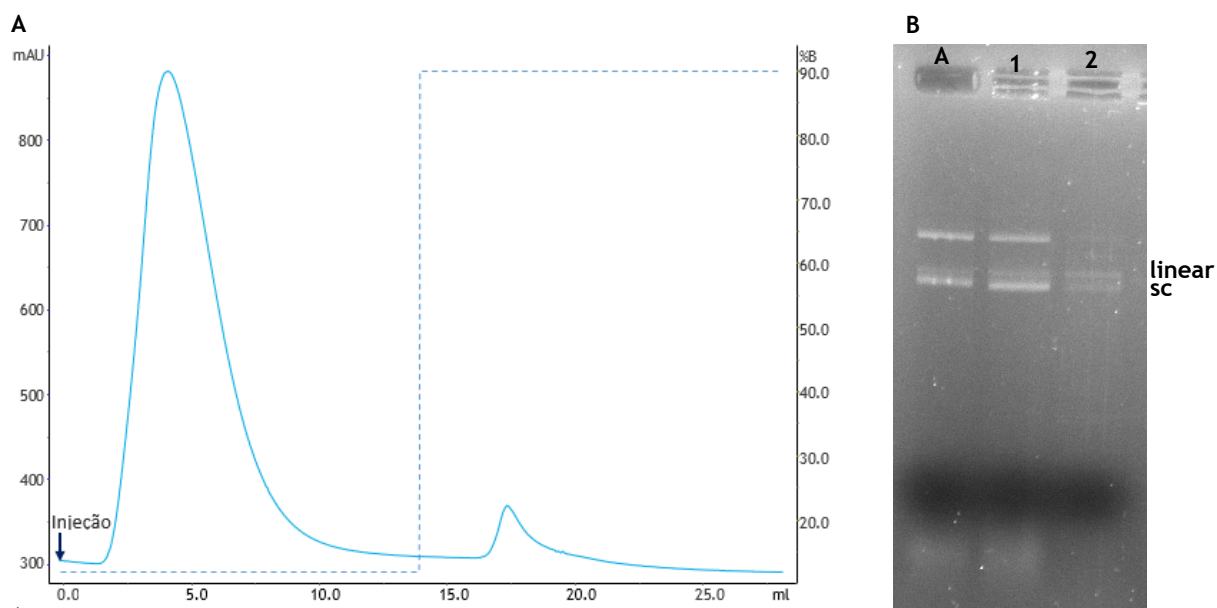


Figura 52: (A) Perfil cromatográfico de lisado de NTC 7482-41H-VA2 HA injetado na coluna de criogel de ácido tiobarbitúrico 5,0 mg/mL. O equilíbrio da coluna foi feito com tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0 e a eluição com por passos a 0,263 M e 2,50 M de tampão acetato de sódio 10,0 mM pH 5,0, como demonstrado pela linha azul-clara em tracejado. Volume de injeção: 10,00 μ L. (B) Electroforese em gel de agarose dos picos obtidos. Linha A: amostra de lisado injetada na coluna; Linha 1: fração correspondente ao pico 1; linha 2: fração correspondente ao pico 2; oc corresponde ao DNA circular aberto; sc corresponde à isoforma superenrolada do pDNA; linear corresponde ao DNA linear.

Este resultado mostrou-se bastante promissor, revelando que nestas condições o suporte apresenta grande seletividade para a isoforma superenrolada do pDNA conseguindo purificá-la a partir de um lisado com contaminantes como o RNA.

3.7. Análise da recuperação e da pureza do pDNA através da coluna analítica fenilsefarose

Para determinar a pureza e grau de recuperação do pDNA nas frações dos picos purificadas com 0,263 e 2,50 M de NaCl através da coluna de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico a pH 5,0, utilizou-se a coluna analítica de Phenyl Sepharose®, através do processo anteriormente descrito, de modo a analisar as áreas dos picos correspondentes dos cromatogramas resultantes. As concentrações de isoformas, gDNA e RNA foram calculadas através da equação obtida na reta de calibração: $[pDNA]=1,929A+2,0376$. Os resultados estão representados na Tabela 10,0.

Tabela 10,0: Concentrações de isoformas, gDNA e RNA.

Pico	[sc + oc] (µg/mL)	[gDNA] e outras impurezas (µg/mL)	RNA (µg/mL)
Lisado	15,197	30,486	0,705
Pico 1	11,627	13,980	0,599
Pico 2 (sc pDNA)	13,339	6,861	0,149

A coluna de Phenyl Sepharose® não permite a distinção entre as suas isoformas do pDNA, mas através da electroforese em gel de agarose anteriormente realizada pode verificar-se que a quantidade de isoformas presente corresponde à isoforma sc. Pela análise da Tabela 10,0 observa-se que existe uma grande recuperação de DNA, sem grandes perdas e que não existe praticamente RNA na amostra, o que confirma os resultados obtidos por electroforese. Apesar de a percentagem de RNA e outras impurezas permanecer ainda acima dos valores exigidos pelas agências internacionais, pode verificar-se uma grande redução na amostra final de pDNA relativamente ao lisado inicial.

Tabela 11: Análise da pureza e grau de recuperação do sc pDNA isolado do lisado de *E.coli* por cromatografia de afinidade através da coluna de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico.

Amostra	Eluição (M NaCl)	Recuperação (%)	Pureza (%)
Lisado	-----	-----	32,0
Pico 1	0,263	12,0	-----
Pico 2 (sc pDNA)	2,50	88,0	65,55

Através da análise das tabelas podemos verificar que o pico 2, que contém o sc DNA, tem uma percentagem de recuperação de 88% e um grau de pureza de 65,550 %, que ainda não está de

acordo com as especificações das agências reguladoras, pelo que precisaria de posterior otimização. No entanto, pode verificar-se que a coluna de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico com 5,0 mg/mL consegue uma redução de 80 % de gDNA, RNA e outras impurezas relativamente à amostra de lisado.

3.7.1. Análise da presença de proteínas na amostra

A presença de impurezas na amostra de pDNA para aplicações terapêuticas pode levar a efeitos secundários irreversíveis. As respostas imunitárias relacionadas com a contaminação por proteínas de um biofármaco para aplicação clínica podem levar a respostas alérgicas e neurológicas, bem como a doenças autoimunes e reações de hipersensibilidade (Ferreira, 2005). Deste modo, é essencial a determinação das proteínas num processo de purificação e purificação de qualquer produto terapêutico, como é o caso da vacina de DNA em estudo. Na tabela 12 está representada uma análise e quantificação de proteínas, através do método de BCA.

Tabela 12: Quantificação das proteínas no lisado injetado e nos picos de interesse;

Amostra	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)
Lisado	0,254
Pico 1	0,008
Pico 2 (sc pDNA)	indetetável

Os resultados do método de BCA, descrito no capítulo 2, indicam que a fração de sc de pDNA apresenta valores indetetáveis de proteínas pelo que estão dentro dos parâmetros exigidos pela FDA (valores indetetáveis de proteínas). Assim, pode concluir-se que as proteínas foram removidas não só no processo de clarificação por precipitação com sulfato de amónio, mas também no processo de purificação por cromatografia de afinidade utilizando o criogel derivatizado com ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico (5,0 mg/mL).

3.7.2. Análise da recuperação e da pureza do pDNA através da coluna analítica Phenil-Sepharose®

Os critérios de qualidade impostos pela FDA incluem não só os níveis de proteínas, mas também os de outras impurezas como o DNA genómico, RNA e endotoxinas (Tabela 13).

Tabela 13: Critérios impostos pela FDA para a qualidade do pDNA (Stadler *et al.*, 2014)

Características	Especificações	Cumprimento das especificações
Aparência	Solução limpa e incolor	✓
Pureza	>97,0 %	✗
Proteínas	Não detetável, por ensaio BCA	✓
gDNA	<2,0 µg/mL de plasmídeo, calculado por PCR	(não testado)
Endotoxinas	<10,0 EU/mL de plasmídeo, calculado por ensaio de LAL	(não testado)
RNA	Não detetável em gel de 0,80 % de agarose	✓

A estratégia cromatográfica utilizada consegue a obtenção de uma solução limpa e incolor, a ausência de RNA em gel de 0,80 % de agarose e um nível indetetável de proteínas que poderia levar a reações de hipersensibilidade e a efeitos adversos no organismo.

Um dos problemas decorrentes da utilização de *Escherichia coli* como hospedeiro para a produção de pDNA é a presença de gDNA. Os fragmentos de genoma do hospedeiro podem codificar um oncogene que pode ativar ou inativar o genoma da célula hospedeira (Ferreira *et al.*, 2005). Deste modo, e para evitar a possibilidade de desenvolvimento de tumores por um paciente que receba o tratamento, a quantificação do gDNA torna-se num alvo de controlo por parte das agências reguladoras, e deve estar presente em quantidades inferiores a 2,0 µg/mL, como representado na tabela. Apesar de não ter sido feita a sua real quantificação por PCR, a área do pico obtido a 1,350 na quantificação pela coluna de Phenyl Sepharose® corresponde ao gDNA. Esta revela que, não obstante o facto de a amostra ainda conter gDNA, a estratégia cromatográfica utilizada consegue uma redução de cerca de 80,0 % de gDNA no pico de interesse, relativamente à amostra de lisado injetada.

Estes resultados mostram que o processo cromatográfico em estudo, apesar de ainda não estar otimizado, é um potencial processo de purificação, separando a isoforma sc do pDNA com valores indetetáveis de proteínas, como requerido pelas agências reguladoras, como a FDA.

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas Futuras

A utilização de vacinas de DNA representa uma nova alternativa à vacinação convencional no tratamento de doenças virais como o Influenza. No entanto, as vacinas de DNA requerem uma grande quantidade, com elevado grau de pureza, da isoforma superenrolada do pDNA, biologicamente ativa, obtida pelos passos de purificação, ao nível do processo *downstream*. A cromatografia tem demonstrado bons resultados na purificação do pDNA, mas as matrizes convencionais usadas para este fim apresentam algumas limitações, como a falta de capacidade para moléculas de grande tamanho como o pDNA. Neste sentido, os criogéis apresentam-se como uma boa alternativa devido às suas características de porosidade, boa difusibilidade e capacidade de ligação às moléculas alvo.

Deste modo, foram preparados suportes cromatográficos baseados em criogéis em condições ácidas e utilizando ligandos barbitúricos representativos como o ácido barbitúrico, tiobarbitúrico e 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico, com densidades de ligando de 5,0, 10,0 e 40,0 mg/mL. O ácido 1,3 difenil-2-tiobarbitúrico foi sintetizado e os três derivados de barbituratos foram imobilizados nos criogéis, pelo método de pós-imobilização já referido. Os suportes cromatográficos foram avaliados por SEM e análise elementar.

Os criogéis derivatizados foram testados em ensaios cromatográficos, nos quais foi avaliada a sua capacidade de retenção do pDNA. Verificou-se que os criogéis com concentrações mais elevadas de ligandos (10,0 e 40,0 mg/mL) apresentavam menor capacidade de retenção de pDNA, o que pode ser justificado pela alteração da estrutura observada por SEM nas condições referidas. O melhor resultado foi obtido com o criogel de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico com 5,0 mg/mL que mostrou capacidade de retenção do pDNA, promovendo também a separação específica da isoforma oc da isoforma sc do pDNA NTC 7482-41H-VA2 HA. Da mesma forma, o suporte de controlo não promoveu qualquer retenção do pDNA, o que comprova a especificidade dos ligandos estudados para o pDNA, sendo as interações estabelecidas unicamente por parte do ligando e não pela matriz cromatográfica.

Assim, neste trabalho de investigação, a aplicação de criogéis com ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico 5,0 mg/mL como matrizes cromatográficas permitiu a purificação de uma vacina de pDNA NTC 7482-41H-VA2 HA com 6.471 kbp que codifica a glicoproteína antigénica de superfície do vírus influenza, hemaglutinina (HA). Na amostra de lisado, a utilização de 10,0mM de tampão acetato de sódio com pH5 como passo de ligação, e uma estratégia de eluição por dois passos usando o mesmo tampão com 0,263 M, seguido de 2,50 M de cloreto de sódio foi

capaz de separar a isoforma superenrolada do DNA do RNA, proteínas e outras impurezas com 65,550 % de pureza e um grau de recuperação de 88,0 %, que ainda não está de acordo com as especificações das agências reguladoras, pelo que precisaria de posterior otimização, mas que já é um resultado muito positivo. No entanto, pode verificar-se que a coluna de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico com 5,0 mg/mL consegue uma redução de cerca de 80% de gDNA, RNA e outras impurezas. Os resultados obtidos demonstram a potencial aplicabilidade dos criogéis de ácido 1,3-difenil-2-tiobarbitúrico com 5,0 mg/mL na separação e purificação das vacinas de pDNA por cromatografia de afinidade, representando este um melhoramento nos passos *downstream* do processo de produção de vacinas de DNA contra o vírus influenza.

No seguimento do presente trabalho propõem-se de seguida algumas linhas de investigação futuras para o melhoramento dos resultados obtidos, nomeadamente, a otimização das condições de eluição até se conseguir um grau de pureza de acordo com as especificações das agências reguladoras e com a avaliação da expressão génica em testes *in vitro* para estimar a eficiência da transfeção do sc pDNA em células eucarióticas e, posteriormente permitir a passagem para ensaios *in vivo*. Adicionalmente, deverão ser estudados a influência da concentração do ligando usado na imobilização e a concentração determinada na matriz por análise elementar e o seu efeito na morfologia dos criogéis.

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

Abdulhaqq, S. A., Weiner, D. B., 2008. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immuno. Res.*, 42, 219-232.

Aguilar-Yanez, J. M., Portillo-Lara, R., Mendoza-Ochoa, G. I., 2010. An influenza A/H1N1/2009 hemagglutinin vaccine produced in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 5, 11694.

Al-dosari, M. S., Gao, X., 2009 Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *AAPS J.*, 11, 671-681.

Allison, J. E., Glezen, W. P., Taber, L. H., Paredes, A. & Webster, R. G. 1977. Reactogenicity and immunogenicity of bivalent influenza A and monovalent influenza B virus vaccines in high-risk children. *J. Infect. Dis.*, 136, S672-S676.

Altintas, E. B., Denizli, A. 2006. Poly(glycidyl methacrylate) beads for dye-affinity purification of lysozyme. *Int. J. Biol. Macromol.*, 38, 99-10,06.

Altintas, E. B., Tüzmen, N., Candan, N., Denizli, A. 2007. Use of magnetic poly(glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. *J. Chromatogr. B.*, 853, 10,05-113.

Ambrosch, F., Fedson, D., Epidemiology of influenza vaccine distribution. Abstract, Options for the control of influenza, IV, 126-145.

Area, E., Martin-Benito, J., Gastaminza, P., Torreira, E., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L. and Ortin, J. 2004. 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10,01, 308-313.

Arrese, M., Portela, A., 1996. Serine 3 is critical for phosphorylation at the N-terminal end of the nucleoprotein of influenza virus A/Victoria/3/75. *J. Virol.*, 70, 3385-3391.

Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. 2003. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *J. Chromatogr. A*, 986, 275-290.

Arvidsson, P., Plieva, F. M., Savina, I. N., Lozinsky, V. I., Fexby, S., Bülow, L., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., 2002. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion exchange columns. *J. Chromatogr. A*, 977, 27-38.

Ault, A., Zajac, A. M., Kong, W. P., 2012. Immunogenicity and clinical protection against equine influenza by DNA vaccination of ponies. *Vaccine*, 30 3965-3974.

- Avery, O. T., MacLeod, C. M., McCarty, M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.*, 79., 137-158.
- Azevedo, V., Levitus, G., Miyoshi, A., Candido, A. L., Goes, A. M., Oliveira, S. C. 1999. Main features of DNA based immunization vectors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 32, 147-153.
- Babac, C., Yavuz, H., Galaev, I. Y., Pişkin, E., Denizli, A. 2006. Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. *React. Funct. Polym.*, 66, 1263-1271.
- Baban, C. K., Cronin, M., O'Hanlon, D., O'Sullivan, G. C., Tangney M., 2010,0. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. *Bioengineered bugs*, 1, 385-394.
- Barbey, R., Laporte, V., Alnabulsi, S., Klok, H.A., 2013 Postpolymerization Modification of Poly (glycidyl methacrylate) Brushes: An XPS Depth-Profiling Study. *Macromolecules*, 46, 6151-6158.
- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., Ruigrok, R. W., 1994. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J.*, 13, 3158-3165.
- Benaglia, M., Alberti, A., Giorgini, L., Magnoni, F., Tozzi, S., 2013. Poly (glycidyl methacrylate): a highly versatile polymeric building block for post-polymerization modifications, *Polym. Chem.*, 4, 124-128.
- Bereli, N., Şener, G., Altıntaş, E.B., Yavuz, H., Denizli, A., 2010,0. Poly (glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G., *Mater. Sci. Eng., C*, 30, 323-329.
- Berthelot, M. P. E. 1859. Violet d'aniline. *Repert De Chimica Applied*, 1, 282-284.
- Billen, J., Desmet, G., (2007) Understanding and design of existing and future chromatographic support formats, *J. Chromatogr. A*, 1168, 73-99.
- Biswas, S. K., Boutz, P. L., Nayak, D.P. 1998. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J. Virol.*, 72, 5493-5501.
- Biswas, S. K., Nayak, D. P., (1994) Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J. Virol.*, 68, 1819- 1826.
- Botsi, S., Tsolomitis, A., 2007. One or two step acid mediated cyclocondensation process for the preparation of 5-carbomethoxy-2-thiouracils from diethyl ethoxymethylenemalonate and thioureas, *Heterocyclic Communications*, 13, 229-234.

- Bouard D., Alazard-Dany, N., Cosset, F. L., 2009. Viral vectors : from virology to transgene expression, *Br. J. Pharmacol.*, 157, 153-165.
- Briane, D., Lesage, D., Cao, A., Coudert, R., Lievre, N., Salzmann, J. L., Taillandier, E., 2002. Cellular pathway of plasmids vectorized by cholesterol-based cationic liposomes. *J. Histochem. Cytochem.*, 50, 983- 991.
- Brito, A., 2015. Funcionalização de criogéis para purificação cromatográfica de DNA plasmídico. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia, Universidade da Beira Interior.
- Brown, M. D., Schätzlein, A. G., Uchegbu, I. F. 2001. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int. J. Pharm.*, 229, 1-21.
- Bui, M., Wills, E. G., Helenius, A., Whittaker, G. R. 2000. Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J. Virol.*, 74, 1781-1786.
- Caramelo-Nunes C., Almeida, P., Marcos, J. C., Tomaz, C.T. 2014. Aromatic ligands for plasmid deoxyribonucleic acid chromatographic analysis and purification: an overview. *J. Chromatogr. A.*, 1327, 1- 13.
- Caramelo-Nunes, C., Almeida, P., Marcos, J. C., Tomaz, C.T., 2013. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA by affinity chromatography using the intercalator DAPP as ligand. *J. Chromatogr. B.*, 928, 121- 124.
- Carnes A. E. 2005. Fermentation Design for the Manufacture of Therapeutic Plasmid DNA. *Bioprocess Int.*, 3, 36-44.
- Ceccherini-nelli L., Vannucci, Lai, L. M., Chiuppesi, F., Ceccherini-nelli, L., Pistello, M., 2013. Viral vectors : A look back and ahead on gene transfer technology, *New Microbiol.*, 36, 1-22.
- Cevher, E., Sezer, A. D., Çaglar, E. S., 2012. Gene delivery systems: recent progresso in viral and non-viral therapy: INTECH Open Access Publisher.
- Chang, H., Huang, C., Wu, J., 2010,0. A single dose of DNA vaccine based on conserved H5N1 subtype proteins provides protection against lethal H5N1 challenge in mice pre-exposed to H1N1 influenza virus. *Virol J*, 7, 197.
- Chellapandian, M., Krishnan, M. R. V., 1998. Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) copolymer for immobilization of urease. *Process Biochem.*, 33, 595-600.
- Chen, M. W., Liao, H. Y., Huang, Y, 2011. Broadly neutralizing DNA vaccine with specific mutation alters the antigenicity and sugarbinding activities of influenza hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 10,08, 3510,0-5.

- Cimecioglu, A. L., Weiss, R. A., 1995. Aromatic Polyamides of 3,8-Diamino-6-phenylphenanthridine and their Molecular complexes with sulfonated Polystyrene Ionomer, *Macromolecules* 28, 6343-6346.
- Coelho, J. F., Ferreira, P. C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C., Góis, J. R., Gil, M. H., 2010. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments, *EPMA J.*, 1, 164-209.
- Colluru, V. T., Johnson, L. E., Ph, D., Olson, B. M., Ph, D., Mcneel, D. G., Ph, D., 2013. Preclinical and clinical development of DNA vaccines for prostate cancer, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, 1-12.
- Colman, P. M., S. A., Nicholson, K. G., Webster, R. G., 1998. Structure and function of the neuraminidase. *Textbook of Influenza*, Blackwell Science, 65-73.
- Coloma, R., Valpuesta, J.M., Arranz, R., Carrascosa, J.L., Ortin, J., MartinBenito, J. 2009. The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog.* 5.
- Compans, R. W., Content, J., Duesberg, P. H., 1972. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J. Virol.*, 10,0, 795-800.
- Cox, N. J., Fukuda, K., 1998. Influenza. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 12, 27-38.
- Cox, N. J., Subbarao, K., 1999. Influenza. *Lancet* 354, 1277-1282.
- Cros, J. F., Garcia-Sastre, A., Palese, P., 2005. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. 6, 205-213.
- Dab, W., Quenel, P., Cohen, J. M., Hannoun, C., 1989. A new influenza surveillance system in France: the Ile-de-France "GROG". 2. Validity of indicators (1984-1989). *Eur. J. Epidemiol.*, 7, 579-587.
- Dainiak, M. B., Galaev, I. Y., Kumar, A., Plieva, F. M., Mattiasson, B., 2007. Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels. *Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol.*, 10,06, 10,01-127.
- Dainiak, M. B., Galaev, I. Y., Matiasson, B., 2006. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. *J. Chromatogr. A*, 1123, 145-150.
- Damshkaln, L. G., Simenel, I. A., Lozinsky, V.I., 1999. Study of cryostructuration of polymer systems. XV. Freeze-thaw-induced formation of cryoprecipitate matter from the low-concentrated aqueous solutions of poly (vinyl alcohol). *J. Appl. Polym. Sci.*, 74, 1978-1986.

- Dankuah, M. K., Forde, G. M., Ho, J., Performande of R-N (R´)-R” funcionalised poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolithic sorbent for plasmid DNA adsorption, *J. Sep. Sci.*, 30, 2843-2850.
- Das, K., Aramini, J.M., Ma, L.C., Krug, R.M., Arnold, E. 2010,0. Structures of Influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17, 530-538.
- Davey, J., Dimmock, N.J., Colman, A., 1985. Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes. *Cell*, 40, 667-675.
- Davenport, F. M., 1964. Comparisons of serologic and ebrile responses in humans to vaccination with influenza A viruses or their hemagglutinins., *J. Lab. Clin. Med.*, 63, 5-13.
- Demiryas, N., Tüzmen, N., Galaev, I. Y., Pişkin, E., Denizli, A., (2007). Poly(acrylamide-allyl glycidyl ethet) Cryogels as a Novel Stationary Phase in Dye-Affinity Chromatograph. *J. Appl. Polym. Sc.*, 10,05, 1808-1816.
- De Smedt, S. C., Demeester, J., Hennink, W. E., (2000) Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.*, 17, 113-126.
- Dinu, M. V., Ozmen, M. M., Dragan, E. S., Okay, O., (2007) Freezing as a path to build macroporous structures: superfast responsive polyacrylamide hydrogels. *Polymer*, 48, no. 1, 195-204.
- Diogo, M. M., Queiroz, J. A., Prazeres, D. M. F., (2003) Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 998, no.1 10,09-117.
- Diogo, M. M., Queiroz, J. A., Prazeres, D. M. F., (2005) Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A.*, 10,069, 3-22.
- Dorman, C. J., (2006) DNA supercoiling and bacterial gene expression. *Sci. Prog.*, 89, 151-166.
- Draghi, L., Resta, S., Pinozzolo, M. G., Tanzi, M. C., (2005) Microspheres leaching for scaffold porosity control. *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 16, 10,093-10,097.
- Edelstein, M. L., (2016, 15/07/2016) Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Disponível em <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>.
- Eisenstein, M., (2011) Vaccines: A moving target. *Nature*, 4, 16-17.
- Elton, D., Medcalf, L., Bishop, K., Harrison, D. and Digard, P. (1999) Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J. Virol.* 73, 7357-7367.

- Ertürk, G., Mattiasson, B., (2014) Cryogels-versatile tools in bioseparation. *J. Chromatogr. A.*, *J. Chromatogr. A.*, 1357, 24-35.
- Extance, A., (2011) Cell-based flu vaccines ready for US prime time. *Nat. Ver. Drug Discov.*, 10,0, 246.
- Faman, D., Frey, D.D., Horvath, C., (2002) Surface and pore diffusion in macroporous and gel-filled gigaporous stationary phases for protein chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 959, 65-73.
- Feng, J., Gulati, U., Zhang, X., Keitel, W. A., Thompson, D. M., James, J. A., (2009) Antibody quantity versus quality after influenza vaccination. *Vaccine*, 27, 6358-6362.
- Ferreira, G. N. M., 2005. Chromatographic approaches in the Purification of Plasmid DNA for Therapy and Vaccination: Review. *Chem. Eng. Technol.*, 28, 1285-1294.
- Ferreira, G. N. M., Monteiro, G. A., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S., 2000. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol.*, 18, 380-388.
- Fishman, D. M., Patterson, G. D., 1996. Light Scattering Studies of Supercoiled and Nicked DNA, *Biopolymers*, 38, 535-552.
- Flingai, S., Czerwonko, M., Goodman, J., Kudchodkar, S. B., Muthumani, K., Weiner, D. B., 2013. Synthetic DNA vaccines : improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants, *Front. Immunol.*, 4, 1-10,0.
- Foldvari, M., Chen, D. W., Calderon, D., Narsineni, L., Ra, A., 2015. Non-viral gene therapy : Gains and challenges of non-invasive administration methods, *J. Control. Release*. 1-59.
- Frechet, J. M., Frantisek S., Vladimi S. 1994. Multimodal Chromatographic separation media and process for using same. International patent number, 531, 66-80.
- Freitas, S. S., Azzoni, A. R., Santos, J. A., Monteiro, G. A., Prazeres, D. M.F. 2007. On the stability of plasmid DNA vectors during cell culture and purification. *Mol. Biotechnol.*, 36, 151-158.
- Gang, E. J., Jeong, J. A., Hong, S. H., Hwang, S. H., Kim, S. W., Yang, I. H. Ahn, C., Han H., Kim, H., 2004. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22, 617-624.
- Gardlik, R., Paiffy, R., Hodosy, J., Lukacs, J., Twrna, J., Celec, P., 2005. Vectors and delivery system in gene therapy. *Med. Sci. Monit.*, 11, 110,0-121.
- Gaspar, M., Maia, J., Queiroz, J. A., Pichon, C., Correia, J., 2014. Improved Minicircle DNA biosynthesis for Gene Therapy Applications, *Hum. Gene Ther.*, 25, 93-10,05.

- Gaspar, V., Correia, I. J., Sousa, A., Silva, F., Catarina M., Paquete B., Queiroz, J., Sousa, F., 2011. Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy. *J. Control. Release*, 156, 212-222.
- Gaspar, V., De Melo-diogo, D., Costa, E., Moreira, A., Queiroz, J., Pichon, C., Correia, I., Sousa F., 2015. Minicircle DNA vectors for gene therapy : advances and applications,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, 15, 353-379.
- Gaspar, V., Sousa, F., Queiroz, J., Correia, I., 2010,0. Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications. *Nanotechnology*, 22, 151.
- Gao, X., Kim, K. S., Liu, D., 2007. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *The AAPS journal*, 9, 92-10,04.
- Ghanem, A., Healey, R., Adly, F. G., 2013. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A Review. *Analytica Chimica Acta*. 760, 1-15.
- Glenting, J., Wessels, S., 2005. Ensuring safety of DNA vaccines, *Microb. Cell. Fact.*, 4, 26-30.
- Glover, D. J., Lipps, H. J., Jans, D. A., 2005. TOWARDS SAFE , NON-VIRAL THERAPEUTIC GENE EXPRESSION IN HUMANS,” *Nat. Rev.*, 6, 299-311.
- Goldstein, E. A., Pons, M. W. 1970. The effect of polyvinylsulfate on the ribonucleoprotein of influenza virus. *Virology*, 41, 382-384.
- Guillén-Sans, R., Guzmán-Chozas, M., 1998. The Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction in Foods: A Review, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 38, no 4, 315-350.
- Guionie, O., Niqueux, E., Amelot, M., Bougeard, S., Jestin, V., 2014. H5-based DNA constructs derived from selected highly pathogenic H5N1 avian influenza virus induce high levels of humoral antibodies in Muscovy ducks against low pathogenic viruses. *Virol J.*,11, 74.
- Gurunathan, S., Klinman, D. M., Seder, R. A., 2000. DNA VACCINES : Immunology , Application , and Optimization, *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 927-974.
- Gun'ko, V. M., Savina, I. N., Mikhalovsky, S. V., 2013. Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 187 e 188, ppp. 1-46.
- Gustavsson, P. E., Lemmens, R., Nyhammar, T., Busson, P., Larsson, P. O., 2004. Purification of plasmid DNA with a new type of anion-exchange beads having a non-charged surface. *J. Chromatogr. A*, 10,038, 131-140.
- Gustavsson, P. E., Axelsson, A., Larsson, P. O. 1999. Superporous agarose beads as a hydrophobic interaction chromatography support. *J. Chromatogr. A*, 830, 275-284.

- Haber, C., Skupsky, J., Lee, A., Lander, R., 2004. Membrane chromatography of DNA: Conformation-induced capacity and selectivity. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 26-34.
- Hage, D. S., 1999. Affinity Chromatography: A review of clinical Applications. *Clin. Chem.*, 45, 593-615.
- Hanora, A., Savina, I., Plieva, F. M., Izumrudov, V. A., Mattiasson, B., Galaev, I. Y., 2006. Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths, *J. Biotechnol.*, 123, no. 3, 343-355.
- Hannoun, C., Dab, W., Cohen, J. M., 1989. A new influenza surveillance system in France: the Ile-de-France "GROG". 1. Principles and methodology. *Eur. J. of Epidemiol.* 5, 285-293.
- Hay, A. J., Lomniczi, B., Bellamy, A. R., Skehel, J. J., 1977. Transcription of the influenza virus genome. *Virology*, 83, 337-355.
- He, C. X., Tabata, Y., Gao, J. Q., 2010,0. Non-viral gene delivery carrier and its three dimensional transfection system. *Int. J. Pharm.*, 386, 232-242.
- He, X., Yao, K., Shen S., Yun, J., 2007. Freezing characterists of acrylamide-based aqueous solution used for the preparation of supermacroporous cryogels via cryocopolymerization. *Chem. Eng. Sci.*, 62, 1334-1342.
- Heggeness, M. H., Smith, P. R., Ulmanen, I., Krug, R. M., Choppin, P. W. 1982. Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus. *Virology*, 118, 466-470.
- Henn, D., DeEugenio D., Barbiturates. *Drugs The Straight Facts*
- Henderson, T. M. A., Ladewig, K., Haylock, D. N., McLean, K. M., O'Connor, A. J., 2013. Cryogels for biomedical applications. *J. Chromatogr. B.*, 1, 2682-2695.
- Henke, A., 2002. DNA immunization - a new chance in vaccine research? *Med. Microbiol. Immunol.*, 191, 187-90.
- Hernández, O. R., Fernández, M. L., Valdes, M. P. P., Díaz, E. M., 2011. Scalable technology to produce pharmaceutical grade plasmid DNA for gene therapy. *Gene Therapy-Developments and Future Perspectives*, Editor PCK InTech.
- Honda, A., Ueda, K., Nagata, K., Ishihama, A., 1987. Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. *J. Biochem.*, 10,02, 1241-1249.
- Honda, A., Ueda, K., Nagata, K., Ishihama, A. 1988. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J. Biochem.* 10,04, 10,021-10,026.

- Huang, X., Zhang, Y., Donahue, H. J., Lowe, T. L., 2007. Porous thermoresponsive-co-biodegradable hydrogels as tissue-engineering scaffolds for 3-dimensional in vitro culture of chondrocytes, *Tissue Eng.*, 13, no 11, 2645-2652.
- Hwang, Y. S., Zhang C., Varghese, S., 2010,0. Poly(ethylene glycol) cryogels as potential cell scaffolds: effect of polymerization conditions on cryogel microstructure and properties. *J. Mater. Chem.*, 20, 345-351.
- Ibraheem, D., Elaissari, A., Fessi, H., 2014. Gene therapy and DNA delivery systems, *Int. J. Pharm.*, 459, no. 1-2, 70-83.
- Ivanov, R. V., Lozinsky, V. I., Noh, S. K., Lee, Y. R., Han, S. S., Lyoo, W. S., 2008. Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced from a high-molecular-weight precursor. II. The influence of the molecular weight of the polymeric precursor. *J. Appl. Polym. Sci.* 10,07, 382-390.
- Janson J.C., Hedman P. 1982. Large-scale chromatography of proteins. *Adv. Biochem. Eng*, 25, 43-99.
- Jennings, P. A., Finch, J. T., Winter, G., Robertson, J. S. 1983. Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA. *Cell*, 34, 619-627.
- Jones, S., Evans, K., McElwaine-Johnn, H., 2009. DNA vaccination protects against an influenza challenge in a double-blind randomised placebo-controlled phase 1b clinical trial. *Vaccine*, 27, 2506-2512.
- Jorba, N., Coloma, R., Ortin, J., 2009. Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog.*, 5.
- Ibraheem, D., Elaissari, A., Fessi, H., 2014. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int. J. Pharm.*, 459, 70-83.
- Kantor, B., Bailey, R. M., Wimberly, K., Kalburgi, S. N., Steven, J., Hill, C., Hill, C., 2015. Methods for Gene Transfer to the Central Nervous System, *Adv. Genet.*, 87, 125-197.
- Katara, D. P., Aeri, V., 2010,0. Progress in gene therapy: A Review. *I.J.T.P.R.*, 1, 33-41.
- Katritzky, E. R., Boulton, A. J., *Advances in Heterocyclic Chemistry*. Academic Press. 13, 19-21.
- Kathuria, N., Tripathi, A., Kar K. K., Kumar, A., 2009~. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering. *Acta Biomater.*, 5, 406-418.

- Kaufmann, K. B., Bu, H., Galy, A. Schambach, A. Grez, M., 2013. Gene therapy on the move, *EMBO Mol. Med.*, 5, no. 11, 1642-1661.
- Kawaguchi, A., Momose, F., Nagata, K., 2011. Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J. Virol.*, 85, 6197-6204.
- Kenawy, E. R., Abdel-Hay, F. I., El-Shanshoury, A. E. R., El-Newehy M. H., 2002. Biologically active polymers. V. Synthesis and antimicrobial activity of modified poly (glycidyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate) derivatives with quaternary ammonium and phosphonium salts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 40, 2384-2393.
- Kendirci, M., Teloken, P. E., Champion, H. C., Hellstrom, W. J., Bivalacqua, G. T. J., 2006. Gene Therapy for Erectile Dysfunction : Fact or Fiction?, *Eur. Urol.*, 50, 1208-1222.
- Kennedy, M. A. 2010,0. A brief review of the basics of immunology: the innate and adaptive response. *Vet. Clin. N. Am.*, 40, 369-379.
- Khan, K. H., 2013. DNA vaccines : roles against diseases,” *GERMS*, 3, no. 1, 26-35.
- Khurana, S., Wu, J., Dimitrova, M.2013. DNA priming prior to inactivated influenza A(H5N1) vaccination expands the antibody epitope repertoire and increases affinity maturation in a boost-intervaldependent manner in adults. *J Infect Dis*, 208, 413-417.
- Kim, Y. C., Yoo, D. G., Compans, R. W., Kang, S.M., Prausnitz, M. R., 2013. Crossprotection by co-immunization with influenza hemagglutinin DNA and inactivated virus vaccine using coated microneedles. *J Control Release*, 172, 579-588.
- Klimov, A. I., Garten, R., Russell, C., Barr, I. G., Besselaar, T. G., Daniels, R., 2012. WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011. *Vaccine* 30, 6461-6471.
- Klinman, D. M., Klaschik, S., Tross, D., Shiota, H., Steinhagen, F., 2010,0. FDA guidance on prophylactic DNA vaccines: analysis and recommendations. *Vaccine*, 28, 2801.
- Kim, Y. C., Yoo, D. G., Compans, R. W., Kang, S. M., Prausnitz, M. R., 2013. Cross-protection by coimmunization with influenza hemagglutinin DNA and inactivated virus vaccine using coated microneedles. *J Control Release*, 172, 579-588.
- Knipe, D. M., Howley, P. M. Griffin D. E. 2001. *Fields Virology* 4th edn., 1487-1531.
- Kobayashi, M., Toyoda, T., Ishihama, A. 1996. Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch. Virol.*, 141, 525-539.
- Kobelt, D., Schlee, M., Schmeer, M., 2013. Performance of High Quality Minicircle DNA for In

Vitro and In Vivo Gene Transfer, *Mol. Biotechnol.*, 53, 80-89.

Kong, S., Titchener-Hooker, N., Levy, M. S. 2006. Plasmid DNA processing for gene therapy and vaccination: Studies on the membrane sterilisation filtration step. *J. Membr. Sci.*, 280, 824-831.

Koutsonanos, D. G., del Pilar Martin, M., Zarnitsyn, V. G., Jacob, J., Prausnitz, M. R., Compans, R. W. 2011. Serological memory and long-term protection to novel H1N1 influenza virus after skin vaccination. *J. Infec. Dis.*, 204, 582-591.

Kubar, T., Hanus, M., Ryjáček, F., Hobza, P., 2006. Binding of cationic and neutral phenanthridine intercalators to a DNA oligomer is controlled by dispersion energy: quantum chemical calculations and molecular mechanics simulations. *Chem. Eur. J.*, 12, 280-290.

Kumar, A., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. *J. Immunol. Methods*, 283, 185-194.

Kutzler, M. A., Weiner, D. B., 2008. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol. Res.*, 42, 219-232.

Lamb, R. A., Krug, R. M., 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology*. Knipe, D.M. and Howley, P.M., Eds., 1487- 1531)

Ledgerwood, J. E., Hu, Z., Gordon, I. J. Influenza virus h5 DNA vaccination is immunogenic by intramuscular and intradermal routes in humans, 2012. *Clin Vaccine Immunol*, 1792-1797.

Ledgerwood, J. E., Wei, C. J., Hu, Z., Gordon, I. J., Enama, M. E., Hendel, C. S., 2011. DNA priming and influenza vaccine immunogenicity: two phase 1 open label randomised clinical trials. *Lancet Infect Dis* 11, 916-924.

Lee, G. Y., Chen, C. H., Wang, T. H., Lee, W. C., 2003. Affinity chromatography of DNA on macroporous copolymerized particles of styrene and glycidyl methacrylate with immobilized polynucleotide. *Anal. Biochem.*, 312, 235-241.

Lentz, T. B., Gray, S. J., Samulski, R. J., 2013. Viral Vectors for Gene Delivery to the Central Nervous System, *Neurobiol Dis.*, 48, 179-188.

Li, F., Dong, P. J., Zhuang, Q. F., 2009. Novel column-based protein refolding strategy using dye-ligand affinity chromatography based on macroporous biomaterial. *J. Chromatogr. A.*, 1216, 4383-4387.

Li, L., Saade, F., Petrovsky, N., 2013. The future of human DNA vaccines, *J. Biotechnol.*, 162, 171-182.

Li, S., Huang, L., 2000. Nonviral gene therapy : promises and challenges, *Gene Ther.*, 7, 31-34.

- Lillethorup, M., Shimizu, K., Plumere, N., Pedersen, S. U., Daasbjerg, K., 2014. Surface-Attached Poly(glycidyl methacrylate) as a Versatile Platform for Creating Dual-Functional Polymer Brushes. *Macromolecules*, 4, 5081–5088.
- Lim, K. L., Jazayeri, S. D., Yeap, S. K., Alitheen, N. B., Bejo, M. H., Ideris, A., 2012. Co-administration of avian influenza virus H5 plasmid DNA with chicken IL-15 and IL-18 enhanced chickens immune responses. *BMC. Vet. Res.*, 8, 132.
- Liu, F., Huang, L., 2002. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J. Control. Release*, 78, 259-266.
- Liu, M. A., 2003. DNA vaccines : a review, *J. Intern. Med.*, 253, 402-410,0.
- Liu, Y., Vrana, N. E., Cahill P. A., McGuinness, G. B., 2009., Cryogels for biomedical applications, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 90, 492-502.
- Lozinsky, V. I., 1998. Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol) solutions. *Russ. Chem. Rev.*, 67, 573-586.
- Lozinsky, V. I., 2002. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and areas of implementation. *Russ. Chem. Rev.*, 71, no. 6, 489-511.
- Lozinsky, V. I., 2008. Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes. *Russ. Chem. Rev.*, 57, 10,015–10,032.
- Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., Mattiasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends Biotechnol.*, 21, no.10,0, 13-25.
- Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y. Mattiasson, B., 2002. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, 10,0, no. 4-5, 163-188.
- Lozinsky, V. I., Vainerman, E. S., Ivanova, S. A., Titova, E. F., Shtil'man, M. I., Belavtseva, E. M., Rogozhin, S. V., (1986) Study of cryostructurization of polymer systems. VI. The influence of the process temperature on the dynamics of formation and structure of cross-linked polyacrylamide cryogels. *Acta Polym.*, 37, no. 3, 142-146.
- Lozinsky, V.I., Vainerman, E. S., Rogozhin, S.V., 1982. Study of cryostructurization of polymer systems. II. The influence of freezing of reacting mass on the properties of products in the preparation of covalently cross-linked gels. *Colloid Polym. Sci.*, 260, no. 8, 776-780.
- Lu, A., Wang, Z., Zhou, Z., Chen, J., Wang, Q., 2015. Application of "hydrogen bonding interaction" in new drug development: design, synthesis, antiviral activity, and SARs of thiourea derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1378-1384.
- Lu, S., 2009. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol.* 21, 346-351.

- Luedtke, N. W., Liu, Q., Ior, Y., 2005. On the electronic structure of ethidium. *Chem. Eur. J.*, 11, 495 - 508.
- Luo D., Saltzman, W. M., 2000. Synthetic DNA delivery systems, *Nat. Am.*, 18, 33-37.
- Luke J., Carnes, A. E., Hodgson, C. P., Williams, J. A., 2009. Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selection system. *Vaccine*, 27, 6454-6459.
- Ma, Z., Ramakrishna, S., 2008. Electrospin regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification. *J. Membr. Sci.*, 319, 23-28.
- Marjuki, H., Alam, M.I., Ehrhardt, C., Wagner, R., Planz, O., Klenk, H.D., Ludwig, S., Pleschka, S. 2006. Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase Calpha-mediated activation of ERK signaling. *J. Biol. Chem.*, 281, 16707-16715.
- Martin-Benito, J., Area, E., Ortega, J., Llorca, O., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L., Ortin, J., 2001. Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep.*, 2, 313-317.
- Mattiasson, B., Kumar, A., Galaev, I. Y., 2009. *Macroporous polymers: Production, Properties and Biotechnological/Biomedical Application*. Boca Raton: CRC Press.
- McDonough, P. G. (1997) The ethics of somatic and germline gene therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 816, 378-382.
- Mehier-Humbert, S., and Guy, R. H., 2005. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 57, 733-753.
- Mena, I., Jambrina, E., Albo, C., Perales, B., Ortin, J., Arrese, M., Vallejo, D. and Portela, A. 1999. Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J. Virol.*, 73, 1186- 1194.
- Misra, V. K., Honig, B., 1995. On the magnitude of the electrostatic contribution to ligand-DNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 92, 4691-4695.
- Moeller, A., Kirchdoerfer, R.N., Potter, C.S., Carragher, B., Wilson, I.A. 2012. Organization of the influenza virus replication machinery. *Science*, 338, 1631-1634.
- Molloy, M. J., Hall, V. S., Bailey, S. I., Griffin, K. J., Faulkner, J., Uden, M., 2004. Effective and robust plasmid topology analysis and the subsequent characterization of the plasmid isoforms thereby observed. *Nucleic Acids Res.*, 32, 129-141.
- Momose, F., Basler, C. F., O'Neill, R. E., Iwamatsu, A., Palese, P., Nagata, K., 2001. Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J. Virol.*, 75, p. 1899-1908.

- Momose, F., Handa, H., Nagata, K., (1996) Identification of host factors that regulate the influenza virus RNA polymerase activity. *Biochimie*, 78, 110,03-110,08.
- Momose, F., Naito, T., Yano, K., Sugimoto, S., Morikawa, Y., Nagata, K., 2002. Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 277, 45306-45314.
- Mondal, P., Thander, L., Chattopadhyay, S. K., 2012. A new entry to the phenanthridine ring system. *Tetrahedron Lett.*, 53, 1328-1331)
- Morel, P. A., Falkner, D., Plowey, J., Larregina, A. T., Falo, J. R. 2004. DNA immunization: altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response. *Vaccine*, 22, 447-456.
- Moussier, N., Bruché, L., Viani, F., Zanda, M., 2003. Fluorinated Barbituric Acid Derivatives: Synthesis and Bio-activity. *Curr. Org. Chem.*, 7, 10,071-10,080.
- Mwangi, W., Brown, W.C., Splitter, G. A., Zhuang, Y., Kegerreis, K., Palmer G. H. 2005. Enhancement of antigen acquisition by dendritic cells and MHC class II-restricted epitope presentation to CD4+ T cells using VP22 DNA vaccine vectors that promote intercellular spreading following initial transfection. *J. Leukoc. Biol.*, 78, 401-11.
- Munier, S., Messai, I., Delair, T., Verrier, B., Ataman-Onal, Y., 2005. Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: comparison of three surfasse polycations for DNA binding, protection and transfection properties. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 94, 1-14.
- Nabati, F., Habibi-Rezaei, M., Amanlou, M., Moosavi-Movahedi, A. A., 2011. Dioxane enhanced immobilization of urease on alkyl modified nano-porous silica using reversible denaturation approach, *J.Mol. Catal. B-Enzym.*, 70, no. 1, 17-22.
- Nagasaki, T., Shinkai, S., 2007. The concept of molecular machinery is useful for design of stimuli-responsive gene delivery systems in the mammalian cell. *J. Incl. Phenom. Macro.*, 58, 205-219.
- Naito, T., Kiyasu, Y., Sugiyama, K., Kimura, A., Nakano, R., Matsukage, A., Nagata, K., 2007. An influenza virus replicon system in yeast identified TatSF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 10,04, 18235-18240.
- Naldini, L., 2015. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, , 526, 351-360.
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., Ali, P. A. 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery, *Adv. Biomed. Res.*, 1, 27.

- Newcomb, L. L., Kuo, R. L., Ye, Q., Jiang, Y., Tao, Y. J., Krug, R. M., 2009. Interaction of influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J. virol.*, 83, 29-36.
- Neumann, D., 2004. The Design and Synthesis of Novel Barbiturates of Pharmaceutical Interest. University of New Orleans.
- Neumann, G., Hughes, M. T., Kawaoka, Y., 2000. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.*, 19, 6751-6758.
- Ng, A. K., 2008. Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J.*, 22, 3638-3647.
- Ng, A. K., Lam, M. K., Zhang, H., Liu, J., Au, S.W., Chan, P.K., Wang, J., Shaw, P.C. 2012. Structural basis for RNA binding and homo-oligomer formation by influenza B virus nucleoprotein. *J. Virol.* 86, 6758-6767.
- Okay, O., 2014. Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties. *Adv. Polym. Sci.*, 263.
- Oliveira, P. H., Mairhofer, J., 2013. Marker-free plasmids for biotechnological applications - implications and perspectives, *Trends Biotechnol.*, 31, no. 9, 539-547.
- O'Neill, R. E., Talon, J., Palese, P., 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.*, 17, 288-296.
- Orkin, S. H. (1986) Molecular genetics and potential gene therapy. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 40, 151-156.
- Oxford, J. S., Lambkin, R., 1998. Targeting influenza virus neuraminidase - a new strategy for antiviral therapy. *Drug Discov. Today*, 3, 448-456.
- Ow, D. S. W., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K. W., Yap, M. G. S. 2006. Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 alpha during batch fermentation, *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 391-398.
- Özgür, E., Bereli, N., Türkmen, D., Ünal S., Denizli, A., 2011. PHEMA cryogel for in-vitro removal of anti-dsDNA antibodies from SLE plasma. *Mater. Sci. Eng. C*, 31, 915-920.
- Ozmen, M. M., Dinu, M. V., Dragan E. S., Okay, O., 2007. Preparation of Macroporous Acrylamide-based Hydrogels: Cryogelation under Isothermal Conditions. *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, 44, 1195-1202.
- Palfy, R., Gardlik, R., Hodosy, J., Behuliak, M., Resko, P., Radványi J., 2006. Bacteria in gene therapy: bactofection versus alternative gene therapy. *Gene ther.*, 13, 10,01-10,05.

- Pathak, A., Patnaik, S., Gupta, K. C. (2009). Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery, *Biotechnol. J.*, 4, 1559-1572.
- Patil, S. D., Rhodes, D. G., Burgess, D. J., 2005. DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems : A Comprehensive Review. *AAPS J.*, 7, no. 1, 61-77.
- Perçin, I., Sağlar, E., Yavuz, H., Aksöz, E., Denizli, A., 2011. Poly (hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification. *Int. J. Biol. Macromol.*, 48, 577-582.
- Parker J. N., Parker, P. M., 2004. Barbiturates.
- Plieva, F. M., Bober, B., Dainiak, M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., 2006. Macroporous polyacrylamide monolithic gels with immobilized metal affinity ligand: The effect of porous structure and ligand coupling chemistry on protein binding. *J. Mol. Recognit.*, (Vol 19, 305-312.
- Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2007. Monolithic gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *J. Sep. Sci.*, 30, 1657-1671)
- Plieva, F. M., Huiting, X., Galaev, I.Y., Bergenstahl, B., Mattiasson, B., 2006. Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure. *J. Mater.Chem.*, 16, 4065-4073.
- Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M. R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev I.Y., 2005. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter* 1 6, 303-309)
- Plieva, F. M., Oknianska, A., Degerman, E., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., 2006. Novel supermacroporous dextran gels. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 17, 10,075-10,092.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., Tordo, N. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.*, 8, 3867-3874.
- Poláková, I., Pokorná, D., Dusková, M., Smahel, M., 2010,0. DNA vaccine against human papillomavirus type 16: modifications of the E6 oncogene. *Vaccine*, 28, 1506-1513)
- Portela, A., Digard, P., 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J. Gen. Virol.*, 83, 723-734.
- Prather, K. J., Sagar, S., Murphy, J., Chartrain, M., 2003. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification, *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 865-883.
- Prazeres, D. M. F., Schlupe, T, Cooney C. 1998. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 806, 31-45.

- Prazeres, D. M., Monteiro, G. A., Ferreira, G. N., Diogo M. M., Ribeiro, S. C., Cabral, J. M. 2001. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 7, 1-30.
- Przybycien, T. M., Pujar, N. S., Steele, L. M. 2004. Alternative bioseparation operations: life beyond packedbed chromatography. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, 469-478.
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z., (2010,0. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* 5, 1-4.
- Raafar, M., Shaker, A., Esam, A., Ishak, A., 2011. Barbituric Acid Utility in Multi-Component Reactions. *Z. Naturforsch.* 66, 1189-1201.
- Rangarajan, S., Friedman, S. H., 2007. Design, synthesis and evaluation of phenanthridine derivatives targeting the telomerase RNA/DNA heteroduplex. *Bioorg. Med. Chem.*, 1, 2267-2273.
- Ratko, T. A., Cummings, J. P., Blebea, J., Matuszewski, K. A., 2003. Clinical gene therapy for nonmalignant disease. *Am. J. Med. Sci.*, 115, 560-569.
- Rauf, M. A., Bukallah, S. B., Hamour, F. A., Nasir, A. S., (2008. Adsorption of dyes from aqueous solutions onto sand and their kinetic behavior, *Chem. Eng. J.*, 137, no. 2, 238-243.
- Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R. and Ortin, J. 2011. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol.*, 8, 207-215.
- Resa-Infante, P., Recuero-Checa, M. A., Zamarreno, N., Llorca, O., Ortin, J., 2010,0. Structural and functional characterization of an influenza virus RNA polymerase-genomic RNA complex. *J. Virol.*, 84, 10,0477-10,0487.
- Reuther, P., Manz, B., Brunotte, L., Schwemmler, M., and Wunderlich, K., 2011. Targeting of the influenza A virus polymerase PB1-PB2 interface indicates strain-specific assembly differences. *J. Virol.*, 85, 13298-13309.
- Rice, J., Ottensmeier, C. H., Stevenson, F. K., 2008. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 8, 10,08-120.
- Resnik, D. B., Langer, P. J. 2001. Human germline gene therapy reconsidered. *Hum. Gene Ther.*, 12, 1449-1458.
- Rodrigues, T., Carrondo, M. J. I., Alves, P. M., Cruz, P. E., 2007. Purification of retroviral vectors for clinical applications: biological implication and technological challenges. *J. Biotechnol.*, 127, 520-541.

- Ross, S. A., Pitié, M., Meunier, B., 2000. A straightforward preparation of primary alkyl triflates and their utility in the synthesis of derivatives of ethidium. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 5, 1-4.
- Rubanyi, G. M., 2001. The future of human gene therapy. *Mol. Aspects Med.*, 22, 113-142.
- Ruigrok, R. W. H., Baudin, F., (1995) Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J. Gen. Virol.* 76, 10,009-10,014.
- Ruigrok, R. W. H., Nicholson, K. G., Webster, R. G., 1998. Structure of influenza A, B and C viruses. *Textbook of Influenza*, Blackwell Science, (pp. 29-42).
- Saade, F., Petrovsky, N., 2012. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 11, 189-209.
- Sagar, S., Watson, M., Lee, A. 2003. *Chromatography-based purification of plasmid DNA*, Marcel Dekker, New York.
- Sahoo, B., Sahu, S. K., Pramanik, P., 2011. A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 69, no. 3, 95-10,02.
- Sahiner, N., Yildiz, S., 2014. Preparation of superporous poly(4-vinyl pyridine) cryogel and their templated metal nanoparticle composites for H₂ production via hydrolysis reactions. *Fuel Process. Technol.*, 126, 324-331.
- Savers, S., 2007. Guidance for industry: Considerations for plasmid DNA vaccines for Infectious Disease Indications. *Biotechnol Law Rep.*, 26, 641-648.
- Savina, I. N., Dainiak, M., Jungvid, H., Mikhalovsky S. V., Galaev, I. Y., Yu, I., 2009. Biomimetic macroporous hydrogels: protein ligand distribution and cell response to the ligand architecture in the scaffold. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 20, no. 12, 1781-1795.
- Seow, Y., Wood, M. J., 2009. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol. Ther.*, (Vo. 17, 767-777).
- Scott, R. P. W., 2003. *Principles and practice of chromatography*. LIBRARYFORSCIENCE
- Schaffner W., (1980) Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, ppp. 2163-2167.
- Sharma, A., Li, X., Bangari, D. S., Mittal, S. K., 2010,0. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery, *Virus Res.*, 143, no. 2, 184-194.
- Schleef, M., Schmidt, T., 2004. Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications. *J. Gene Med. Suppl.*, 1, 45-53.

- Schleef, M., 2001. Plasmids for therapy and vaccination. Wiley-VCH, Weinheim
- Shi, X., Macgregor, R. B., 2007. The effect of charge on the volume change of DNA binding with intercalator DAPP. *J. Phys. Chem. B.*, 1, 11-13.
- Schulte, H., (1954) Über die Kondensation des N,N'-diphenylthioharnstoffes mit Malonylchlorid, *European Journal of Inorganic Chemistry, Eur. J. Inorg. Chem.*, 87, 820-824.
- Silva, F., Passarinha, L., Sousa, F., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., 2008. Influence of Growth Conditions on Plasmid DNA Production, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 51-54.
- Silva, F., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., 2012. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*, *Biotechnol. Adv.*, 30, no. 3, 691-708.
- Smith, L. R., Wloch, M. K., Ye, M. 2010,0. Phase 1 clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin. *Vaccine*, 28, 2565-2572.
- Somia, N., Verma, I. M., 2000. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet.*, 1, 91-99.
- Souibgui, A., Gaucher, A., Marrot, J., Bourdreux, F., Aloui, F., Ben Hassine, B., Prim, D., 2014. New series of acridines and phenanthrolines: synthesis and characterization. *Tetrahedron*, 70, 3042-3048.
- Sousa, Â., Almeida, A., Cernigoj, J., Sousa, F., Queiroz, J., 2011. Histamine monolith versatility to purify supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid from *Escherichia coli* lysate. *J. Chromatogr. A*, 1355, 125-133.
- Sousa, Â., Pereira, P., Sousa, F., Queiroz, J. A., 2014. Binding mechanisms for histamine and agmatine ligands in plasmid deoxyribonucleic acid purifications, *J. Chromatogr. A*, 1366, 110,0-119.
- Sousa, Â., Sousa, F., Queiroz, J. A., 2010,0. Differential interactions of plasmid DNA, RNA and genomic DNA with amino acid-based affinity matrices, *J. Sep. Sci.*, 33, 2610,0-2618)
- Sousa, Â., Sousa, F., Queiroz, J. A., 2011. Impact of lysine-affinity chromatography on supercoiled plasmid DNA purification. *J. Chromatogr. B*, 879, 3507-3515.
- Sousa, Â., Sousa, F., Queiroz, J. A., 2012. Advances in Chromatographic supports for pharmaceutical grade plasmid DNA purification: A Review. *J. Sep. Sci.* 35, 3046-3058.
- Sousa, Â., Tomaz, C., Sousa, F., Queiroz, J. A., 2011. Successful application of monolithic innovative technology using a carbonyldiimidazole disk to purify supercoiled plasmid DNA suitable for pharmaceutical applications. *J. Chromatogr. A*, 1218, 8333-8343.
- Sousa, F., Freitas, S., Azzoni, A. R., Prazeres, D. M. F., Queiroz, J., 2006. Selective purification

of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine - agarose chromatography step, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 45, 131-140.

Sousa, F., Passarinha, L., Queiroz, J. A., 2009. Biomedical application of plasmid DNA in gene therapy: A new challenge for chromatography, *Biotechnol. Genet. Eng., Vet Clin N Am.*, 26, 83-116)

Sousa, F., Prazeres, D. M. F., Queiroz, J. A., 2008. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA, *Trends Biotechnol.*, 26, no. 9, 518-525.

Sousa, F., Prazeres, D. M. F., Queiroz, J. A., 2009. Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *J Gene Med.*, 11, 79-88.

Sousa, F., Tomaz, C., Prazeres, D. M. F., Queiroz, J., 2005. Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support. *Anal. Biochem.*, 343, 183-185.

Stachowiak, A. N., Bershteyn, A., Tzatzalos E., Irvine, D. J. 2005. Bioactive hydrogels with an ordered cellular structure combine interconnected macroporosity and robust mechanical properties, *Adv. Mater.* 17, no. 4, 399-403.

Stadler, J., Lemmens, R., Nyhammar, T., 2004. Plasmid DNA purification: A Review. *J Genet Med.*, 6, 554-566.

Steinhauer, D. A., Wharton, S. A., Nicholson, K. G., Webster, R. G., 1998. Structure and function of the haemagglutinin. *Textbook of Influenza*, Blackwell Science, (pp. 54-64.

Sun, M. S., Li, L. Z., Liu, Y., Shao, Y. M. (2007. Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1139, 228-35.

Stone, D., 2010,0. Novel viral vector systems for gene therapy. *Viruses*, 2, 10,002-10,007.

Stryjewska, A., Kiepusa, K., Librowski, T., Lochynski, S., 2013. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part II. Monoclonal antibodies , modern vaccines and gene therapy, *Pharmacol. Reports*, 65, 10,085-110,01.

Tan, L., Lu, H., Zhang, D. 2010,0. Protection against H1N1 influenza challenge by a DNA vaccine expressing H3/H1 subtype hemagglutinin combined with MHC class II-restricted epitopes. *Virology*, 7, 363.

Tan, L., Lu, H., Zhang, D., 2011. Efficacy of seasonal pandemic influenza hemagglutinin DNA vaccines delivered by electroporation against a seasonal H1N1 virus challenge in mice. *Sci China. Life Sci*, 54,293-299

- Tao, Y. J., Ye, Q., 2010,0. Influenza A Virus Nucleoprotein. *Influenza: Molecular Virology*. (pp. 53-68).
- Tejeda-Mansir, A., Montesinos, R. M., 2008. Upstream processing of plasmid DNA for vaccine and gene therapy applications. *Recent Pat. Biotechnol.*, 2, 156-172.
- Theobald, R. S., Schofield, K., (1949) *The Chemistry of phenanthridine and its derivatives*.
- Thomas, C. M., Summers, D., 2008. *Bacterial plasmids*. eLS.
- Tricco, A. C., 2013. Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 11, 153-162.
- Tripathi, A., Kathuria, N., Kumar, A., 2009. Elastic and macroporous agarose-gelatin cryogels with isotropic and anisotropic porosity for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 90, 680-694.
- Tumir, L. M., Radić Stojković, M., Piantanida, I., 2014. Come-back of phenanthridine and phenanthridinium derivatives in the 21st century. *J. Org. Chem.*, 10,0, 2930-2954.
- Tummatorn, J., Krajangsri, S., Norseeda, K., Thongsornkleeb, C., Ruchirawat, S., 2014. A new synthetic approach to 6-unsubstituted phenanthridine and phenanthridine-like compounds under mild and metal-free conditions. *Org. Biomol. Chem.*, 12, 5077-5081.
- Turrell, L., Lyall, J. W., Tiley, L. S., Fodor, E., Vreede, F. T., 2013. The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 4, 1591.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S., E., Podes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowi, S. H., Randall, H., Deck, R., Dewitt, C. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L., Liu, M. A. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 259, 1745-1749.
- Ulmer, J. B., Wahren, B., Liu, M. A. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol. Med.*, 12, 216-222.
- Uygun, M., Akduman, B., Akgöl, S., Denizli, A., 2013. A New Metal-chelated cryogel for reversible Immobilization of urease. *Appl. Biochem. Biotech.*, 170, 1815-1826.
- Uygun, D. A., Karagözler, A. A., Akgöl, S., Denizli, A., (2009. Magnetic hydrophobic affinity nanobeads for lysozyme separation. *Mater. Sci. Eng. C*, 29, no. 7,2165-2173.
- Uygun, M., Uygun, D. A., Özçalışkan, E., Akgöl, S., Denizli, A. (2012. Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. *J. Chromatogr. B*, 887-888, 73-78.

- Valente, J. F. A., Sousa, A., Queiroz, J. A., Sousa, F., 2014. Selective purification of supercoiled p53-encoding pDNA with L -methionine - agarose matrix, *Anal. Biochem.*, 459, 61-69.
- Van Gaal, E. V. B., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A., Mastrobattista, E., 2006. Plasmid Engineering for Controlled and Sustained Gene Expression for Nonviral Gene Therapy, *Pharm. Res.* 23, 10,053-10,074.
- Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Lippens, E., Cornelissen M., Schacht, E. 2009. Correlation between cryogenic parameters and physico-chemical properties of porous gelatina cryogels. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 20, no. 10,0, 1417-1438.
- Varghese, J. N., Laver, W. G., Colman, P. M., (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 303, 35-40.
- Vassaux, G., Nitcheu, J., Jezzard, S., Lemoine, N. R., 2006. Bacterial gene therapy strategies. *The Journal of pathology*, 208, 290-298.
- Vázquez, R., Brito, J. E., Pérez, M., Silva, R., Seralena, A., Dueñas-Carrera, S., Frontela, M.C., Herrera, A. M. 2005. Plasmid DNA production for gene therapy and therapeutic or preventive vaccination in humans: a challenge for the pharmaceutical industry, *Biotechnol. Apl.*, 22,251-255.
- Verma I. M., Somia, N., (1997) Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature*, 389, p.239-242.
- Vreede, F. T., Jung, T. E., Brownlee, G. G., 2004. Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J. Virol.*, 78, 9568-9572.
- Wang, F., Zhao, P., Xi, C., 2011. Copper-catalyzed one-pot synthesis of 2-thioxo-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-ones from ortho-bromobenzamides and isothiocyanates. *Tetrahedron Lett.*, 52,231-235.
- Watson, J., Crick, F., (1993) Molecular structure of nucleic acid: a structure for deoxyribose nucleic acid. *JAMA*, 269, 1966-1967.
- Wei, C. J., Boyington, J. C., McTamney, P. M., 2010,0. Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination. *Science*, 329, 10,060-10,064.
- Wei, G. B., Ma, P. X., 2009. Partially Nanofibrous Architecture of 3D Tissue Engineering Scaffolds, *Biomaterials*, 30, 6426-6434.
- Weinjie, Z., Yizhi, J. T., 2013. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *EEBS lett.*, 587, 1206-1214.

- Wickham, T. J., 2003. Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. *Nat. Med.*, 9, 135-139.
- Wiesener, N., Schutze, T., Lapp, S., 2011. Analysis of different DNA vaccines for protection of experimental influenza A virus infection. *Viral Immunol*, 24, 321-330.
- Williams, J. A., Carnes, A. E., Hodgson, C. P., 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.*, 27, 353-370.
- Wilkinson, T. M., Li, C. K., Chui, C. S., Huang A. K., Perkins, M., Liebner, J. C., 2012. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat Med.*, 18,274-280.
- Wirth, T., Parker, N., Ylä-herttua S., 2013. "History of gene therapy," *Gene*, 525, no.2, 162-169.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247, 1465-1468.
- Wunderlich, K., 2009. Identification of a PA-binding peptide with inhibitory activity against influenza A and B virus replication. *PLoS ONE* 4.
- Xu, F., Sridharan, B., Durmus, N. G., Wang, S., Yavuz, A. S., Gurkan U. A., Demirci, U., 2011. Living Bacterial Sacrificial Porogens to Engineer Decellularized Porous Scaffolds, *PLoS One*, 6.
- Xu, Y., Yuen, P., Lam, J. K., 2014. Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives," *Pharmaceutics*, 6, 378-415.
- Yamanaka, K., Ishihama, A., Nagata, K., (1990) Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J. Biol. Chem.*, 265, 11151-11155.
- Ye, Q., Guu, T.S., Mata, D.A., Kuo, R.L., Smith, B., Krug, R.M., Tao, Y.J. 2012. Biochemical and structural evidence in support of a coherent model for the formation of the double-helical influenza a virus ribonucleoprotein. *MBio*, 4
- Ye, Q., Krug, R. M., Tao, Y. J., 2006. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, 444, 10,078-10,082.
- Yilmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, D., 2009. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. *Biochem. Eng. J.*, 43, no.3,272-279.
- Yin, X., Wang, W., Zhu, X., Wang, Y., Wu, S., Wang, Z., Wang, L., Du, Z., Gao, J., Yu, J., 2015. "Synergistic antitumor efficacy of combined DNA vaccines targeting tumor cells and angiogenesis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 465, no.2,239-244.

Zhang, S., Xu, Y., Wang, W., Qiao, D., Liu, D., Li, Z., 2004. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J. Control. Release*, 10,00, 165-180.

Zhu X., Alexandratos S. D., (2005. Polystyrene-supported amines: affinity for mercury (II) as a function of the pendant groups and the Hg(II) counterion. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44, 8605–8610,0.