



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Estudo das interações entre intercaladores e pDNA para terapia molecular

Zélia Patrícia Cordeiro Proença

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Carla Patrícia Alves Freire Madeira Cruz
Coorientadora: Prof. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz

Covilhã, outubro de 2014

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Carla Cruz e à minha coorientadora Professora Doutora Cândida Tomaz, pela orientação e preocupação constante durante o meu trabalho. Um agradecimento especial à minha orientadora, por toda a dedicação, formação, amizade e disponibilidade mostrada ao longo deste ano.

Ao Professor João Queiroz e à Professora Fani Sousa, gostaria de agradecer a sua contribuição no desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos de laboratório, pela amizade, carinho, paciência que demonstraram durante todo o ano letivo, em particular à Mestre Élia Mota e à Doutora Catarina Nunes pelo auxílio, apoio, ajuda e partilha de conhecimentos científicos.

Agradeço também aos meus amigos e família, especialmente à Marta Esteves, à Patrícia Pousada, à Susana Alves, à Valentina Sardinha, ao Davide Silva, ao Rui Raposo e aos meus avós, por toda a amizade, carinho e força fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos meus irmãos, Ana Rita e António por todo o carinho, amizade, paciência e apoio durante todo o meu percurso académico.

Ao Vítor Santos, pelo apoio, carinho, companheirismo demonstrado ao longo de toda a minha vida académica essenciais para a concretização da minha formação.

Finalmente, um agradecimento muito especial aos meus pais, por todos os sacrifícios feitos a nível económico de maneira a possibilitar a minha formação, apoio, ajuda nos momentos mais difíceis e força para que acreditasse que conseguiria alcançar todos os desafios.

Resumo

Nas últimas décadas o desenvolvimento da terapia genética e a produção de vacinas de DNA têm sido promissores para tratar e controlar determinadas patologias através da transferência de genes. O DNA plasmídico (pDNA) tem sido utilizado como vetor não viral com intuito terapêutico, nomeadamente a conformação superenrolada (sc). Têm sido propostas várias metodologias para a sua purificação, nomeadamente processos baseados na cromatografia de afinidade (AC), pois esta é considerada específica para a separação da isoforma sc, através do reconhecimento bioespecífico do ligando imobilizado.

O presente estudo descreve a síntese e caracterização de ligandos aromáticos derivados de naftaleno e piridina e posterior imobilização na matriz *Sepharose*®. A caracterização do suporte ligando A-*Sepharose*® foi realizada por ressonância magnética de alta resolução de ângulo mágico (HR-MAS RMN) de modo a avaliar se o ligando foi covalentemente ligado à matriz. A afinidade entre os ligandos, 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP), ligando A e ligando D e as isoformas do plasmídeo pVAX1-*LacZ* (sc e linear (ln)) foi determinada por ressonância plasmónica de superfície (RPS). A caracterização das interações biomoleculares entre os suportes ligando A e DAPP e os mononucleótidos foi realizada por ressonância magnética nuclear - diferença de transferência de saturação (RMN-STD).

Os resultados de RMN-STD mostram que o 5'-CMP e os 3'- 5'-AMP interagem com os suportes DAPP-*Sepharose*® e ligando A-*Sepharose*®, preferencialmente pelas bases, sugerindo empilhamento π - π entre os anéis aromáticos dos ligandos e os mononucleótidos. O 5'-TMP interage preferencialmente pelo grupo metilo sugerindo interações hidrofóbicas com ambos os suportes. Contrariamente, o 5'-GMP interage com o suporte DAPP-*Sepharose*® pela desoxirribose sugerindo interações hidrofóbicas e de *van der Waals*. Através da análise por RPS verificou-se que o ligando DAPP interage apenas com as isoformas (sc e ln) na presença do tampão acetato de sódio 10 mM a pH 5 e às temperaturas 10 ° C e 25 ° C. Verificou-se ainda, que o ligando A apresenta maior afinidade em Tris-HCl ($K_D=8,65 \times 10^{-8} \pm 1,0 \times 10^{-8}$ M) a 25 ° C para a isoforma sc, enquanto que o DAPP tem maior afinidade em acetato de sódio ($K_D=5,77 \times 10^{-9} \pm 3,1 \times 10^{-9}$ M) a 25 ° C para a isoforma ln. Relativamente ao ligando D, verificou-se que às temperaturas 10 ° C e 25 ° C não há diferença significativa na afinidade para as duas isoformas. Deste modo os resultados apresentados sugerem que o ligando A é promissor para ser utilizado em AC na purificação de plasmídeos.

Palavras-chave

Terapias moleculares; DNA plasmídico; Ligandos de afinidade; RMN-STD; RPS; Cromatografia de afinidade; Intercaladores de DNA.

Abstract

In the last decades the development of gene therapy and the production of DNA vaccines have been promising to treat and control some diseases by gene transference. Plasmid DNA (pDNA) has been used as a non-viral vector with a therapeutic purpose, namely the supercoiled conformation (sc). Several methodologies were proposed for its purification namely processes based on affinity chromatography (AC), since it is specific to separate the sc isoform through biospecific recognition of the immobilized ligand.

The present study describes the synthesis and characterization of aromatic ligands derived from naphthalene and pyridine and subsequent immobilization in Sepharose® matrix. The characterization of the ligand A-Sepharose® support was performed by a high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy in order to evaluate if the ligand was covalently bound to the matrix. The affinity between the 3,8-diamino-6-phenylphenanthridine (DAPP), ligand A and ligand D and the isoforms of the pVAX1-LacZ plasmid (sc and linear (ln)) was determined by surface plasmon resonance (SPR). The characterization of biomolecular interactions between the ligand A and DAPP supports and mononucleotides was accomplished by saturation transfer difference nuclear magnetic resonance (STD-NMR). The STD-NMR results showed that the 5'-CMP and 3'- 5'-AMP interact with DAPP-Sepharose® and ligand A-Sepharose® supports, namely by the bases, suggesting π - π stacking between the aromatic rings of ligands and mononucleotides. The 5'-TMP interacts preferentially by the methyl group suggesting hydrophobic interactions with both supports. In contrast, the 5'-GMP interacts with the DAPP-Sepharose® support by the deoxyribose suggesting hydrophobic and van der Waals interactions. By SPR analysis it was found that the ligand DAPP only interacts with isoforms (sc and ln) in the presence of 10 mM sodium acetate buffer pH 5 at 10 °C and 25 °C. It was also found that the ligand A has a higher affinity in Tris-HCl ($K_D = 8,65 \times 10^{-8} \pm 1,0 \times 10^{-8}$ M) at 25 °C for sc isoform, while DAPP has the higher affinity in sodium acetate ($K_D = 5,77 \times 10^{-9} \pm 3,1 \times 10^{-9}$ M) at 25 °C for ln isoform. Relatively to ligand D, it was found that there is no significant difference in affinity for the two isoforms at 10 °C and 25 °C. Thus, the presented results suggest that the ligand A is promising to be used in AC for the purification of plasmids.

Keywords

Molecular therapies; Plasmid DNA; Affinity ligands; STD-NMR; SPR; Affinity Chromatography; DNA intercalators.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 - Evolução e progressos clínicos das terapias moleculares	1
1.2 - Biossíntese de DNA plasmídico	4
1.2.1 - Vetores de DNA plasmídico como aplicação terapêutica	4
1.2.1.1 - Estrutura de DNA plasmídico	4
1.2.1.2 - Produção e purificação de DNA plasmídico	5
1.2.1.3 - Aplicação de técnicas cromatográficas para a purificação de DNA plasmídico	7
1.2.1.3.1 - Cromatografia de afinidade	8
1.2.1.3.2 - Ligandos aromáticos de afinidade	10
1.2.1.4 - Técnicas de análise de interação ligandos-DNA plasmídico	14
1.2.1.4.1 - Ressonância Magnética Nuclear-Diferença de Transferência de Saturação	14
1.2.1.4.2 - Ressonância Plasmônica de Superfície	15
Capítulo 2 - Objetivos	18
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	19
3.1 - Materiais	19
3.1.1 - Reagentes	19
3.1.2 - Reagentes utilizados na produção e purificação do plasmídeo pVAX1-LacZ	20
3.2 - Equipamentos	21
3.3 - Métodos	23
3.3.1 - Síntese e caracterização dos ligandos e suportes	23
3.3.1.1 - Síntese do ligando A	23
3.3.1.2 - Síntese do ligando B	25
3.3.1.3 - Síntese do ligando C	26
3.3.1.4 - Síntese do ligando D	27
3.3.2 - Síntese dos suportes	28
3.3.3 - Produção e Purificação do plasmídeo	29
3.3.3.1 - Condições de crescimento da <i>Escherichia coli</i> DH5α e plasmídeo	29
3.3.4 - Lise alcalina celular e produção de pVAX1-LacZ	30
3.3.5 - Isolamento das isoformas do pDNA	31
3.3.5.1 - Isoforma sc	31
3.3.5.2 - Isoforma oc	31
3.3.5.3 - Isoforma ln	31
3.3.6 - Eletroforese em gel de agarose	31
3.3.7 - Estudo das interações ligandos-pDNA	32
3.3.7.1 - Técnica RMN-STD	32
3.3.7.2 - Caracterização do suporte utilizando a técnica de HR-MAS RMN	32

3.3.7.3 - Técnica RPS utilizando o biossensor Biacore T200	32
3.3.7.3.1 - Imobilização dos ligandos	33
3.3.7.3.3 - Determinação da afinidade	33
3.3.7.3.4 - Regeneração	34
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	35
4.1 - Síntese e caracterização dos ligandos	35
4.1.1 - Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico	37
4.2 - Estudo da afinidade entre as isoformas do pDNA e os ligandos utilizando a técnica de RPS	44
Capítulo 5 - Conclusões	51
Capítulo 6 - Perspetivas futuras	52
Referências	53
Anexos	59
Anexo I	60
Anexo II	62
Anexo III	64
Anexo IV	65

Lista de Figuras

Páginas

Capítulo 1 - Introdução

Figura 1.1 - Vetores usados em ensaios clínicos de terapia genética, correspondendo o n ao número de ensaios clínicos realizados (Adaptado de Ginn et al., 2013)	2
Figura 1.2 - Representação esquemática das etapas envolvidas no processamento para a produção de pDNA (Adaptado de Prazeres et al., 1999; Sousa et al., 2008b)	7
Figura 1.3 - Estrutura básica 3D do DNA e as interações de bases: (A) Representação da estrutura dupla-hélice de DNA; (B) Bases purinas (A e G) e pirimidinas (T e C); (C) Interações complementar dos pares de bases (ligações de hidrogénio) (Adaptado de Hannon, 2007; Neto e Lapis, 2009)	11
Figura 1.4 - Forma B-DNA (GCATATATGC) ₂ (esquerda) com uma molécula de brometo de etídio intercalada (direita) (Adaptado de Kubar et al., 2005)	11
Figura 1.5 - Estruturas química dos ligandos aromáticos utilizados neste trabalho (formas não protonadas)	13
Figura 1.6 - Representação esquemática da experiência de RMN-STD em que o espectro final é obtido pela subtração do espectro de referência (<i>off resonance</i>) com o espectro saturado (<i>on resonance</i>). (a) Saturação <i>off resonance</i> . (b) Saturação <i>on resonance</i> . (Adaptado de Viegas et al., 2011; Wagstaff et al., 2013)	14
Figura 1.7 - Esquema das etapas da técnica de RPS. (a) Esquema ilustrativo da estrutura da superfície de um sensor chip CM5; (b) Ativação da matriz de carboximetil dextrano sobre a superfície através de uma mistura de EDC/NHS utilizando o método de imobilização através dos grupos amina dos ligandos; (c) Princípio de deteção do RPS, representado num sensograma (Adaptado de Handbook BSS, 2008)	17

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Figura 3.1 - Síntese do ligando A (Clares et al., 2004; Carbonell et al., 2013)	23
Figura 3.2 - Síntese do ligando B (Carbonell et al., 2013)	25
Figura 3.3 - Síntese do ligando C (Carbonell et al., 2013)	26
Figura 3.4 - Síntese do ligando D (Carbonell et al., 2013)	27

Figura 3.5 - Síntese dos suportes descrito pelo método de Sundberg and Porath, 1974). (A) Ativação dos grupos epóxidos da <i>Sepharose</i> ® CL-6B. (B) Imobilização do DAPP no suporte. (C) Imobilização do ligando A no suporte	28
Figura 3.6 - Características do vetor pVAX1- <i>LacZ</i> com 6,05 Kpb, contendo um promotor CMV, sítio de iniciação T7, sítio de clonagem múltipla, sítio de iniciação <i>reverse</i> BGH, sinal de poliadenilação BGH, gene de resistência à kanamicina e origem de pUC	29

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Figura 4.1 - Síntese dos ligandos	35
Figura 4.2 - Estrutura química dos ligandos sintetizados, designados por ligandos A, B, C e D, respetivamente	36
Figura 4.3 - (a) Espectro de ¹ H RMN-HR-MAS do ligando A- <i>Sepharose</i> ®. (b) Espectro de ¹ H RMN-HR-MAS da <i>Sepharose</i> ® ativada. (c) Espectro de ¹ H RMN-HR-MAS do ligando A	37
Figura 4.4 - Técnica de RMN-STD onde foram analisados os suportes DAPP- <i>Sepharose</i> ® e ligando A- <i>Sepharose</i> ® com os respetivos 3'- e 5'-mononucleótidos num tubo de RMN de 5 mm	38
Figura 4.4.1 - Espetros de RMN-STD. (a) Espectro de referência de ¹ H RMN do 5'-CMP; (b) Espectro de ¹ H RMN-STD do 5'-CMP: suporte DAPP e (c) Espectro de ¹ H RMN-STD de 5'-CMP: suporte ligando A	39
Figura 4.4.2 - Espetros de RMN-STD. (d) Espectro de referência de ¹ H RMN de 5'-GMP (e) Espectro de ¹ H RMN-STD de 5'-GMP: suporte DAPP e (f) Espectro de ¹ H RMN-STD de 5'-GMP:suporte ligando A	40
Figura 4.4.3 - Espetros de RMN-STD. (g) Espectro de referência de ¹ H RMN do 5'-TMP (h) Espectro de ¹ H RMN-STD do 5'-TMP: suporte DAPP e (i) Espectro de ¹ H RMN-STD de 5'-TMP: suporte ligando A	40
Figura 4.4.4 - Espetros de RMN-STD. (j) Espectro de referência de ¹ H RMN de 3'-AMP e (k) Espectro de ¹ H RMN-STD de 3'-AMP: suporte DAPP	41
Figura 4.4.5 - Espetros de RMN-STD. (l) Espectro de referência de ¹ H RMN de 5'-AMP e (m) Espectro de ¹ H RMN-STD de 5'-AMP: suporte ligando A	41
Figura 4.4.6 - Intensidades relativas dos mononucleótidos com os suportes DAPP- <i>Sepharose</i> ®- (cor uniforme) e ligando A- <i>Sepharose</i> ® (cor desvanecida)	42
Figura 4.5 - Eletroforese em gel de agarose 1 % com o marcador de peso molecular (M) e as três isoformas (oc, ln e sc) de pVAX1- <i>LacZ</i> com 6,05 kpb	44
Figura 4.6 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando DAPP: isoforma ln em acetato de sódio-CH ₃ COOH a 25 °C	46
Figura 4.7 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando D: isoforma sc em Tris-HCl a 25 °C	47
Figura 4.8 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando D: isoforma sc em Tris-HCl a 10 °C	48

Figura 4.9 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando A: isoforma sc em Tris-HCl a 25 °C 49

Figura 4.10 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando A: isoforma ln em Tris-HCl a 10 °C 50

Lista de Tabelas

Páginas

Capítulo 1 - Introdução

Tabela 1 - Quadro resumo das características de ligandos aromáticos utilizados na purificação de pDNA	9
---	---

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Tabela 2 - Quadro resumo dos reagentes utilizados na síntese e respetivo rendimento	36
Tabela 3 - Valores de K_D obtidos para as isoformas sc e ln e os ligandos DAPP, A e D às temperaturas de 10 °C e 25 °C nos tampões Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e acetato de sódio-CH ₃ COOH 10 mM pH 5,0	45

Lista de Acrónimos

δ	Desvio químico
3'-AMP	Adenosina-3'-monofosfato
3aPBA	Ácido 3-amino fenilborónico
5'-AMP	Adenosina-5'-monofosfato
5'-CMP	Citidina-5'-monofosfato
5'-GMP	Guanosina-5'-monofosfato de sal disódico hidratado
5'-TMP	Timina-5'-monofosfato de sal disódico hidratado
Abs	Absorvância
AC	Cromatografia de afinidade
AEC	Cromatografia de troca aniónica
AT	Adenina-Timina
ATPS	Fase líquida em sistemas aquosos em duas fases
Berenil	4,4' - (1-triazeno-1,3-di-il) bis - benzenocarboximidamida
BGH	Hormona de crescimento bovino
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CH ₃ COOH	Ácido acético
CMV	Citomegalovírus humano
COSY	Espetro bidimensional de correlação ¹ H- ¹ H
D	Dimensão
D ₂ O	Água deuterada
DAPP	3,8-diamino-6-fenilfenantridina
DBC	Capacidade dinâmica de ligação
DEAE	Dietilaminoetanol
DEPT135	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DEPT90	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
EA	Análise Elementar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido tetraacético etileno-diamina
EMA	Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos
EP	Eletroporação
EU	Unidade de endotoxina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-IR	Espetroscopia de Infravermelhos Transformada de Fourier
GC	Guanina-Citosina
gDNA	DNA genómico
HAC	Cromatografia de afinidade hidroxiapatite
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-bond Correlation</i>
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HR-MAS	Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>

IMAC	Cromatografia de afinidade de metal imobilizado
J	Constante de acoplamento
Kb ou kbp	Kilo par bases
K_D	Constante de dissociação de equilíbrio
LBagar	Luria-Bertani agar
LPS	Lipopolissacarídeo
ln	Linear
m/z	Massa/carga
M_r	Massa molecular relativa
MS	Espetro de Massa
NHS	N-hidroxissuccinimida
NOE	Efeito nuclear <i>Overhauser</i>
oc	Circular aberto
pDNA	DNA plasmídico
ppm	Partes por milhão
®	Marca registada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN-STD	Ressonância Magnética Nuclear-Diferença de Transferência de Saturação
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RPIPC	Cromatografia de par-ião de fase reversa
RPLC	Cromatografia líquida de fase reversa
rpm	Rotações por minuto
RPS	Ressonância plasmónica de superfície
RU	Unidades de ressonância
sc	Superenrolado
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento
STD	Diferença de Transferência de Saturação
TAC	Cromatografia de adsorção tiofílica
TAE	Ácido tris-acético
TB	Terrific Broth
THAC	Cromatografia de afinidade hélice tripla
TIR	Reflexão total interna
<i>tren</i>	Tris (2-aminoetil) amina
Tris	Tris (hidroximetil) metilamina
TSP	Ácido 3- (trimetilsilil) propiónico- <i>d4</i>
UBI	Universidade da Beira Interior
UV	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloroindol-3-il- β -D-galactopiranoside

Capítulo 1 - Introdução

1.1 - Evolução e progressos clínicos das terapias moleculares

No início dos anos 80, as técnicas de subclonagem de genes de mamíferos em plasmídeos procariotas e bacteriófagos foram implementados como precursoras de técnicas de terapia genética humana (Flotte, 2007). O primeiro ensaio de terapia genética humana foi realizado por Rosenberg et al., 1990. Desde então mais de 1843 ensaios clínicos foram realizados, tendo sido aprovados em 31 países (Ginn et al., 2013).

A grande maioria dos ensaios clínicos de terapia genética (81,5%) foi destinada ao tratamento de cancro (64,4% dos ensaios), às doenças cardiovasculares (8,4%) e a doenças monogénicas herdadas (22,4% das quais direcionadas para a fibrose cística), sendo estas últimas as que mais sucesso tem alcançado. Além disso, foram realizados ensaios para o tratamento de doenças infecciosas (8,0% do total), doenças neurológicas, tratamento de patologias oculares e doenças inflamatórias (Ginn et al., 2013).

Contudo, o primeiro produto de terapia genética (vetor de adenovírus contendo o gene p53) direcionado para o tratamento do cancro, foi o Gendicine, desenvolvido por SiBiono GeneTech Co na China e aprovado para uso clínico pelo *Chinese State Food e Drug Administration* em 2003 (Patil et al., 2005; Edelstein et al., 2007).

Desde então, tem havido um notável desenvolvimento, tanto no número de genes humanos diretamente associados aos estados de doença, o tipo de ensaios realizados, a segurança e eficácia do tratamento, como também no número de sistemas de vetores disponíveis para expressar esses genes para fins terapêuticos (Edelstein et al., 2007; Flotte, 2007).

Por conseguinte, tem-se verificado um aumento progressivo da investigação sobre aplicações biotecnológicas de ácido desoxirribonucleico (DNA), por forma a utilizar as terapias moleculares como procedimentos terapêuticos alternativos aos tratamentos clássicos. Do mesmo modo, o principal desafio destas terapias, como a terapia genética, as vacinas de DNA e biofármacos recombinantes (Sousa et al., 2009a), baseia-se na introdução mediada por um vetor de uma molécula de ácido nucleico terapêutico nas células selecionadas, sendo possível manipular a informação genética de diversos organismos de maneira a apresentar as características desejadas, com o auxílio de ferramentas genéticas avançadas (Sousa et al., 2008b). Portanto, não só a terapia genética teve uma grande relevância nas últimas décadas, como também as vacinas de DNA se mostraram promissoras e potencialmente revolucionárias. As terapias moleculares têm sido aplicadas em inúmeros ensaios clínicos através do uso de diversos vetores como transporte de genes terapêuticos. Assim, têm sido utilizados vetores

virais e, mais recentemente, o uso de vetores não virais. Os vetores virais utilizados na terapia genética proporcionam uma elevada eficiência na entrega do material genético para as células alvo. Porém, tem-se verificado um declínio no uso destes vetores (apenas 19,7% dos ensaios em 2013, em comparação com 22,8% em 2007) devido às preocupações de segurança demonstradas e à pequena capacidade de armazenar o DNA terapêutico (Edelstein et al., 2007; Ginn et al., 2013). Os fatores de risco associados a estes sistemas envolvem problemas relacionados com a mutagênese de inserção e/ou problemas relacionados com a imunogenicidade e a citotoxicidade (Jackson et al., 2006). Apesar de a sua utilização estar a diminuir consideravelmente, vetores como, o adenovírus (23,3% dos ensaios), o *Gamma*-retrovírus ou retrovírus (19,7%), o vírus vaccinia (7,9%), poxvírus (5,0%), o vírus adeno-associado (4,9%), o vírus herpes simples (3,1%) e o lentivírus (2,9%), ainda têm sido aplicados em ensaios de terapia genética (Figura 1.1) (Ginn et al., 2013).

Por outro lado, verifica-se um aumento gradual no uso de vetores não virais como é o caso de DNA plasmídico (pDNA) (18,3%), seguido de métodos de transferência de genes não virais por lipofecção envolvendo lipossomas catiónicos/conjugados de DNA (5,9%) (Flotte, 2007; Ginn et al., 2013).

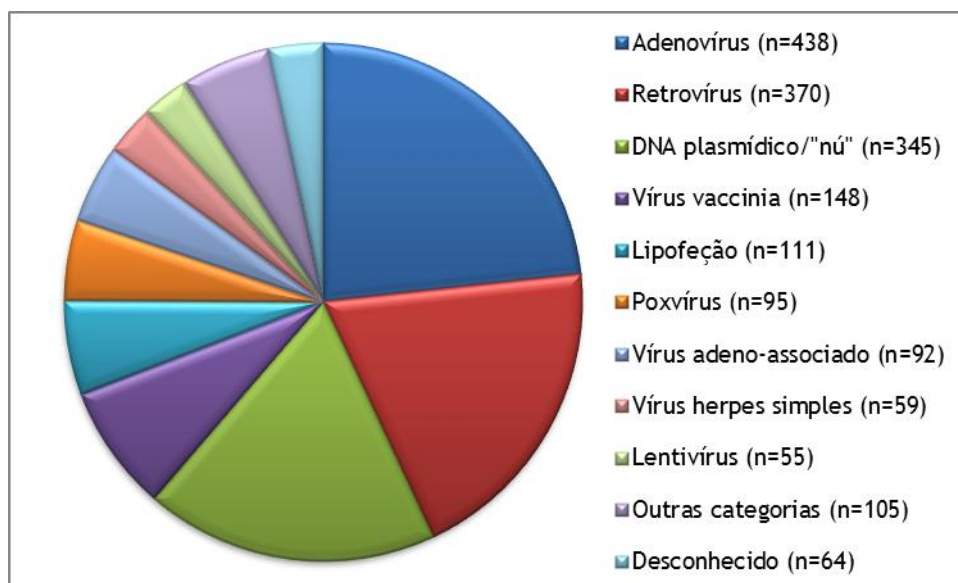


Figura 1.1 - Vetores usados em ensaios clínicos de terapia genética, correspondendo o n ao número de ensaios clínicos realizados (Adaptado de Ginn et al., 2013).

Os vetores não virais utilizam o DNA, e quando este é injetado diretamente em determinados tecidos (especialmente muscular) produzem níveis significativos de expressão genética, embora menor do que os obtidos com vetores virais (Edelstein et al., 2007; Ginn et al., 2013). Assim, o pDNA é promissor para aplicação tanto em terapia genética como na vacinação de DNA, aquando da expressão de proteínas terapêuticas (Barbosa et al., 2010).

As vacinas de DNA representam uma nova abordagem às antigas vacinas, através do melhoramento da estimulação do sistema imunitário de um indivíduo e são potencialmente menos caras (Mateen e Irshad, 2011). Inicialmente foram desenvolvidas as vacinas de primeira

geração por Louis Pasteur, depois as de segunda geração e, mais recentemente, as vacinas de terceira geração. As vacinas de primeira geração utilizam formas de microrganismos mortos e atenuados, as de segunda usam componentes naturais ou recombinantes definidos de organismos inteiros, e por último, as de terceira usam o ácido nucleico (Mateen e Irshad, 2011). Desta forma, houve um melhoramento significativo das vacinas quanto à integração dos plasmídeos nas células alvo, resistência aos antibióticos (uma vez que o processo de produção dos plasmídeos envolve seleção de células bacterianas portadoras deste) e à imunogenicidade (Mateen e Irshad, 2011). Assim, as vacinas de DNA induzem uma vasta gama de respostas imunes mais eficientes, são de fácil fabrico e mais seguras, comparativamente às abordagens anteriores (Patil et al., 2005; Sousa et al., 2008b; Ferraro et al., 2011; Khan, 2013).

Comparativamente à terapia genética, as vacinas de DNA foram avaliadas em 43 ensaios clínicos para doenças virais e não virais, sendo a maioria (62%) para vacinas de vírus da imunodeficiência humana (HIV) (33%) ou de cancros (29%). Os restantes 38% de ensaios clínicos ativos estão a ser realizados para vacinas contra a gripe, hepatite B e C, vírus do papiloma humano (HPV) e malária (Ferraro et al., 2011). Segundo Oliveira et al., 2009, as vacinas de DNA são mais estáveis do que as vacinas à base de proteínas, ou microrganismos, embora a criação de uma vacina de DNA seja problemática para garantir a sua integridade estrutural. Efetivamente, o tipo de vacinas de DNA e a organização geral dos elementos genéticos presentes, apresentam um impacto direto e comprometedor, não só na produção em massa, mas também na sua estabilidade, eficácia e, finalmente, na sua aprovação clínica. Ainda assim, novas estratégias impulsionaram melhorias no resultado da vacinação. Estas estratégias incluem a seleção e otimização dos antígenos codificados pelos plasmídeos, tipo de vetor, a dose, o tempo, a melhoria da formulação e a inclusão de agentes adjuvantes moleculares para melhorar as respostas imunes e diretas (Ferraro et al., 2011; Khan, 2013). Por outro lado, vários métodos físicos têm sido estudados para facilitar a eficiência de transfeção das vacinas de DNA incluindo abordagens sem agulha como: bombardeamento de partículas, entrega de alta-pressão, adesivos dérmicos e eletroporação (EP) (Ferraro et al., 2011).

1.2 - Biossíntese de DNA plasmídico

1.2.1 - Vetores de DNA plasmídico como aplicação terapêutica

A molécula de DNA tem sido uma das fontes mais importantes, não só, para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, mas também para compreensão da base fundamental da vida humana. A maioria dos fármacos promissores à base de DNA encontram-se em estágios iniciais de ensaios clínicos, tendo estes progredido nos últimos anos de forma a melhorar algumas doenças, tais como o cancro, a sida, e até mesmo perturbações neurológicas como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, e desordens cardiovasculares (Patil et al., 2005).

1.2.1.1 - Estrutura de DNA plasmídico

Alguns autores (Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2008b; Oliveira et al., 2009) descrevem a estrutura do pDNA como sendo intrinsecamente dinâmica, altamente compacta, de dupla hélice, com um comprimento de cerca de 2-20 kilo bases (kb) e um peso molecular de 10^6 - 10^7 Daltons. O enrolamento das duas cadeias anti-paralelas em torno de si e de um eixo comum originam a estrutura clássica de dupla-hélice, que é estabilizada por ligações de hidrogénio entre os pares de bases Adenina-Timina (AT) e Guanina-Citosina (GC) e por forças de empilhamento (Diogo et al., 2005). Cada cadeia de pDNA é um polímero linear de ácido desoxirribonucleico ligado por ligações fosfodiéster, com grupos fosfato carregados negativamente quando o pH é superior a 4, sendo hidrofílicos, enquanto que o interior da dupla hélice é altamente hidrofóbico (Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2008b)

Desta forma, os plasmídeos podem assumir diversas conformações, se bem que a forma mais típica é a forma B negativa denominada superenrolada (sc). Biologicamente, a isoforma sc é vantajosa porque promove o desenrolamento necessário e a separação da cadeia durante a replicação e transcrição. Porém, a clivagem sucessiva de uma cadeia ou de ambas as cadeias de pDNA sc leva ao relaxamento das moléculas que podem aparecer na isoforma circular aberta (oc) e linear (ln), respetivamente (Sousa et al., 2009b). Estas isoformas podem também ser encontradas em lisados de células (Diogo et al., 2005). A ocorrência de diferentes estruturas de pDNA acontece devido ao *stress supercoiling* ou a condições como elevada temperatura e pH extremo (Sousa et al., 2008b). Assim, o aumento da temperatura resultará em movimento térmico prologando promovendo um desenrolamento gradual da hélice de DNA (Sousa et al., 2008b).

Os vetores de plasmídeos necessitam de conter um certo número de elementos básicos, tais como uma unidade de expressão eucariótica (abrangendo a região do promotor, local de clonagem múltipla, gene de interesse e um terminador de transcrição de poli-adenilação),

uma origem procariótica de replicação e um marcador de seleção para propagação em bactérias (Oliveira et al., 2009). Após a construção do vetor que codifica o gene de interesse, este pode ser biossintetizado (Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2006; Sousa et al., 2009b; Sousa e Queiroz, 2011) por replicação autónoma num hospedeiro adequado como *Escherichia coli* (*E. coli*), por fermentação, sendo esta bactéria considerada como produtor de muitas proteínas recombinantes, com um historial seguro na bioindústria. Existem várias técnicas que podem ser usadas para romper as células de *E. coli* e, portanto, obter as moléculas pDNA estáveis, sendo o método mais utilizado a lise alcalina (Diogo et al., 2005). Após o processo de purificação, o produto é formulado e o plasmídeo é entregue às células eucarióticas para expressar a proteína de interesse.

A isoforma sc de pDNA é considerada a mais eficaz na transferência de expressão de genes do que as isoformas oc e ln (Sousa et al., 2009b). Os plasmídeos que são destinados a aplicações terapêuticas contêm genes humanos ou não humanos, e têm um tamanho maior ($M_r > 10^6$, tamanho na ordem de μm) do que as proteínas (Diogo et al., 2005).

1.2.1.2 - Produção e purificação de DNA plasmídico

Nos últimos anos houve um aumento da produção eficaz de pDNA terapêutico, e nos passos essenciais do processo *downstream* para garantir uma produção em larga escala de moléculas mais puras e estáveis, num curto espaço de tempo (Figura 1.2) (Eon-Duval e Burke, 2004; Oliveira et al., 2009).

O mecanismo de ação do pDNA exige que as moléculas de plasmídeo tenham acesso ao núcleo após a entrada no citoplasma, sendo essa entrada possível através dos poros nucleares podendo ser um acesso extremamente desafiador e difícil. O processo nuclear, ou a falta dele, eventualmente, controla a eficiência da expressão genética (Patil et al., 2005). Além disso, como resultado da natureza epicromossomal do pDNA, a expressão do gene nos tecidos alvo é transitória. A baixa eficácia e curta duração de expressão de genes, levaram a que as aplicações clínicas sejam suscetíveis de exigir grandes quantidades de pDNA puro (Sousa et al., 2006).

O número e a complexidade das etapas de processamento na extração, isolamento, purificação e formulação podem induzir *stress* estrutural ao pDNA (Sousa et al., 2010). No decorrer das manipulações de extração e isolamento de pDNA, devem ser tomados cuidados para evitar clivagem de gDNA (DNA genómico), podendo resultar pequenos fragmentos desagregados (Diogo et al., 2005). Existem operações que podem remover o gDNA desnaturado (eliminado com um passo de desnaturação durante o processo de lise alcalina) e o ácido ribonucleico (RNA) (reduzido por adição de enzimas de digestão, tal como a RNase (Ribonuclease)), enquanto a maioria do pDNA permanece no sobrenadante (Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2008b). Uma estratégia alternativa de reduzir a presença de RNA e de outras impurezas, é utilizar métodos de concentração e clarificação ao longo do processo de

isolamento primário, isto é, reduzir as impurezas e o volume do processo, respetivamente (Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2008b). Por outro lado, o lisado alcalino resultante tipicamente contém proteínas, RNA, lipopolissacarídeos (LPS), fragmentos de gDNA, e menos do que 3 % (w/w) de pDNA (Sousa et al., 2010). Além disso, a maior parte das impurezas existentes apresentam características comuns, como a carga negativa (RNA, gDNA e endotoxinas), massa molecular (gDNA e endotoxinas) e hidrofobicidade (endotoxinas) (Sousa et al., 2010). Estas características limitam significativamente a separação e purificação do pDNA, independentemente da técnica a ter em conta (Sousa et al., 2008b).

A recuperação e purificação de moléculas de pDNA do lisado celular podem envolver vários procedimentos, utilizando, técnicas de ultracentrifugação, extração por solvente, extração da fase líquida em sistemas aquosos em duas fases (ATPS) (Barbosa et al., 2010) ou precipitação utilizando surfatantes (solventes, sais, detergentes) (Sousa et al., 2009b). Muitos destes protocolos não podem ser implementados devido aos reagentes utilizados ou enzimas derivadas de animais, visto que não são compatíveis com as recomendações das agências reguladoras para a produção de agentes terapêuticos (Eon-Duval e Burke, 2004; Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2008b). Embora, os processos de purificação exijam uma sequência de operações unitárias, é possível obter-se um extrato de pDNA sc altamente enriquecido, estável e contendo o teor mínimo de impurezas recomendado (Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2006; Sousa et al., 2009b).

Os requisitos das agências reguladoras, como a *Food and Drug Administration* (FDA) e Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos (EMA) têm de ser cumpridos, relativamente à pureza, quantificação da atividade biológica, segurança e eficácia (Eon-Duval e Burke, 2004; Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2006). Tipicamente, o pDNA deve apresentar uma aparência incolor (límpida), homogénea, e conter teores de contaminantes dentro dos seguintes limites: gDNA (< 2 µg gDNA/mg de pDNA), proteínas (não detetável), RNA (não detetável) e endotoxinas (< 0,1 EU (Unidades de endotoxina)/µg de pDNA) (Sousa et al., 2009b; Sousa et al., 2010). A remoção de endotoxinas é particularmente importante, uma vez que estes componentes de LPS presentes na parede celular da *E. coli* podem produzir sintomas do síndrome do choque tóxico, bem como, reduzir drasticamente a eficiência de transfeção e exibir efeitos citotóxicos em células de mamíferos (Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2006; Sousa et al., 2008b). Contudo, mais de 98% do pDNA deve apresentar a isoforma sc, uma vez que esta é a mais eficaz na transferência de expressão de genes (Sousa e Queiroz, 2011).

Por conseguinte, a monitorização da produção, a eficiência da purificação e o controle da qualidade pDNA durante o processamento e nas formulações finais, são fundamentais para a identificação e quantificação do mesmo (Sousa et al., 2005).

Assim, deve ter-se em conta não só a produção em larga escala da isoforma sc para a aplicação clínica, como também a separação das restantes isoformas e o cumprimento das normas impostas pelas agências reguladoras, na escolha do processo de purificação. (Diogo et al., 2005; Sousa et al., 2009b). Desta forma, o método mais comum para a purificação do pDNA, após a lise celular, é a cromatografia.

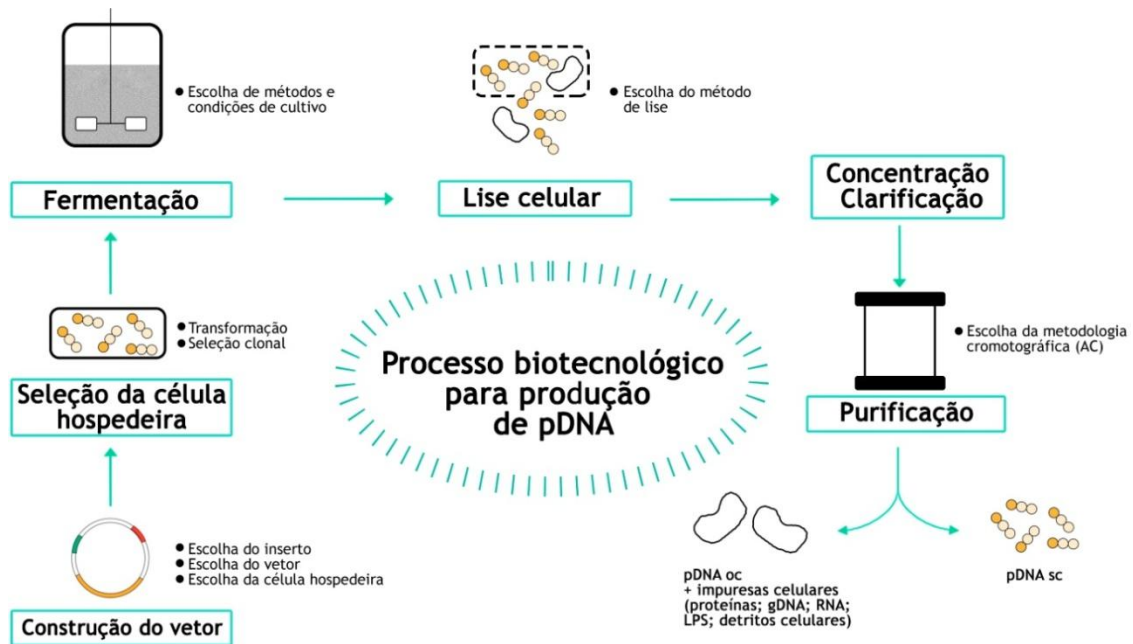


Figura 1.2 - Representação esquemática das etapas envolvidas no processamento para a produção de pDNA (Adaptado de Prazeres et al., 1999; Sousa et al., 2008b).

1.2.1.3 - Aplicação de técnicas cromatográficas para a purificação de DNA plasmídico

A cromatografia tem como objetivo remover os componentes celulares do hospedeiro (RNA, proteínas, fragmentos de gDNA, endotoxinas) e as isoformas de pDNA, como a oc, que são virtualmente impossíveis de remover por outras técnicas (Sousa et al., 2009b; Barbosa et al., 2010). Existem diferentes técnicas cromatográficas, como exclusão molecular (SEC), troca aniônica (AEC), interação hidrofóbica (HIC), líquida de fase reversa (RPLC), par-ão de fase reversa (RPIPC), adsorção tiofílica (TAC) e afinidade (AC) que podem ser aplicadas integradas, separadas ou em conjunto, em vários processos para a purificação de pDNA terapêutico (Diogo et al., 2005). Estes processos cromatográficos permitem explorar propriedades inerentes ao pDNA (tais como a carga, o tamanho, a hidrofobicidade, a acessibilidade das bases dos nucleótidos), bem como limitações impostas da topologia do superenrolamento e/ou afinidade (Sousa et al., 2008b). Contudo, a baixa seletividade de separação exibida pelas fases estacionárias e a semelhança da afinidade das impurezas para o pDNA, têm sido um dos principais obstáculos encontrados na cromatografia (Sousa et al., 2009b). Deste modo, a AC tem sido amplamente utilizada para a purificação de pDNA devido à sua especificidade.

1.2.1.3.1 - Cromatografia de afinidade

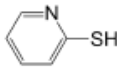
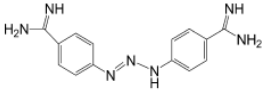
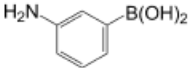
Têm sido utilizadas diversas estratégias *downstream* baseadas em AC para a purificação de biomoléculas terapêuticas, sendo esta técnica mais seletiva e economicamente viável (Sousa et al., 2008b). A AC utiliza ligandos de afinidade para separar ou purificar biomoléculas com base na sua função biológica ou estrutura química. A AC tem como vantagens a eliminação de passos adicionais de purificação devido à especificidade dos ligandos e ao aumento do rendimento do processo de purificação. Contudo, também apresenta limitações, especialmente no que diz respeito à origem biológica dos ligandos, ou seja, à sua estabilidade (Sousa et al., 2008b). Assim, diferentes metodologias de AC têm sido utilizadas, nomeadamente cromatografia de hélice tripla (THAC) (Wils et al., 1997; Schlupe e Cooney, 1998, 1999), metal imobilizado (IMAC) (Murphy et al., 2003), proteína-DNA (Woodgate et al., 2002), hidroxiapatite (HAC) (Colman et al., 1978, Johnson e Ilan, 1983) e polimixina B (Montbriand e Malone, 1996).

A composição da matriz em AC deve conter na sua estrutura química, grupos funcionais reativos na superfície, tais como hidroxilo (por exemplo a *Sepharose*® CL-6B), carboxilo ou amida para posterior ativação e imobilização de ligandos (Cruz et al., 2011a). A *Sepharose*®, marca registada de uma matriz de agarose, tem sido utilizada, pois apresenta vantagens como baixo custo, é inerte para a maioria das biomoléculas, e encontra-se comercialmente disponível (Cruz et al., 2011a).

Vários ligandos que estabelecem interações específicas com o pDNA foram já utilizados em AC, destacando-se por exemplo, aminoácidos e derivados (Sousa et al., 2009a) e compostos aromáticos (Caramelo-Nunes et al., 2014). Diferentes tipos de aminoácidos básicos como, a L-histidina (Sousa et al., 2005), L-arginina (Sousa et al., 2008a) e L-lisina (Sousa et al., 2009a) foram utilizados em AC para separar pDNA sc do lisado de *E. coli* numa escala preparativa em determinadas condições de força iónica, temperatura e pH. Estes suportes cromatográficos com ligandos biospecíficos (aminoácidos) além de purificarem o pDNA, também permitiram separar e purificar outras moléculas, tais como proteínas (Jahreis et al., 2001), imunoglobulina (Hua et al., 2006), oligossacarídeos (Delattre et al., 2005) e oligogalacturonídeos (Delattre et al., 2008). A AC foi também utilizada para estudar a interação entre os aminoácidos atrás descritos e polinucleótidos de diferentes tamanhos e composição, com o objetivo de servirem de modelos para explicar a interação com o pDNA (Cruz et al., 2013).

Outros ligandos sintéticos aromáticos, como a 2-mercaptopiridina (Bonturi et al., 2013), o 4,4' - (1-triazeno-1,3-di-il) bis - benzenocarboximidamida (Berenil) (Caramelo-Nunes et al., 2012) e o ácido 3-amino fenilborónico (3aPBA) (Raiado-Pereira et al., 2012), foram utilizados para purificação cromatográfica de pDNA por AC e estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Quadro resumo das características de ligandos aromáticos utilizados na purificação de pDNA.

Ligandos	Tamanho pDNA (kpb) testado	Interação com DNA	Características essenciais do método de cromatografia	Eficiência de purificação de pDNA
2-Mercaptopiridina 	3,697, 5,4 e 6,125	Possivelmente um pseudo-intercalador; Interações hidrofóbicas.	Uso de sulfato de amónio moderado a alto ou fosfato de potássio.	Rendimento moderado (68,5%); Pode separar sc pDNA de impurezas.
Berenil 	6,05 e 12,361	Ligação na <i>groove</i> menor do DNA; Interações hidrofóbicas e eletrostáticas, ligações de hidrogénio.	Uso de sulfato de amónio moderado;	Bom rendimento (85%); Purificação eficiente de impurezas; Sem separação isoformas.
3aPBA 	6,05	Não há interação.	Nenhuma separação de isoformas de preferência 1,2-cis-diol (RNA e endotoxina); Reduzido ou nenhum uso de sal; Apropriado para o passo intermediário: RNA e redução de endotoxinas.	Excelente rendimento (96%); Sem purificação eficiente pDNA.

O uso de berenil e o 3,8-diamino-6-fenilfenantridina (DAPP) proporcionaram a purificação de uma amostra de pDNA de forma eficiente (Caramelo-Nunes et al., 2014). Porém, o suporte berenil-*Sepharose*® não separa pDNA sc das restantes isoformas quando presentes numa solução de lisado complexo, sendo apenas alcançada a purificação de pDNA total (Caramelo-Nunes et al., 2012). A utilização de DAPP parece ser a abordagem mais promissora comparativamente com os anteriores. O DAPP mostra resultados eficientes na separação e purificação da isoforma sc de plasmídeos com tamanhos diferentes (pVAX1-*LacZ* e pCAMBIA-1303 com 6,05 kilo pares de bases (kbp) e 12,361 kbp, respetivamente) em soluções de lisado clarificado celular (Caramelo-Nunes et al., 2013b, 2014).

Por conseguinte, o requisito essencial para a seleção do suporte cromatográfico para a purificação da biomolécula baseia-se no conhecimento das interações específicas ligando/biomolécula que determinam a especificidade *in situ* do suporte. Além disso, este processo de reconhecimento molecular é mediado, por interações não covalentes (Cruz et al.,

2013), nomeadamente, interações eletrostáticas, hidrofóbicas, forças de *van der Waals*, pontes de hidrogénio (Sousa et al., 2008b), catião- π , CH- π e empilhamento π - π (Cruz et al., 2013).

Além da cromatografia de afinidade (através da determinação da capacidade dinâmica de ligação (DBC) e do tempo de retenção) e da análise das estruturas DNA-proteínas determinadas por difração de raios-X, outras técnicas têm sido utilizadas para a análise e identificação das interações envolvidas entre estes sistemas, tais como a ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância plasmónica de superfície (RPS) utilizando um biossensor ótico (Cruz et al., 2011b). Assim, complementando a informação estrutural obtida por este conjunto de técnicas é possível selecionar os ligandos de afinidade mais específicos que permitam a purificação do pDNA sc.

1.2.1.3.2 - Ligandos aromáticos de afinidade

O desenvolvimento de um sistema de purificação por AC tem como passo crucial a aplicação de um ligando natural ou sintético. Um dos ligandos sintéticos anteriormente descrito, imobilizado numa matriz de *Sepharose*® ativada com grupos epóxidos foi o DAPP (Caramelo-Nunes et al., 2013b, 2014). O método de imobilização descrito por Sundberg e Porath em 1974, utilizou DAPP:*Sepharose*® 1:6 (g/g), resultando numa densidade de ligando de 0,15 mmol DAPP/g *Sepharose*® derivatizada (42,8 mg DAPP/g *Sepharose*® derivatizada) (Caramelo-Nunes et al., 2013b). Este ligando usado em AC para purificação de pDNA, também tem sido usado como parte da estruturação de matrizes poliméricas (Cimecioglu e Weiss, 1995), como corante fluorescente (Zhang e Lakowicz, 2005), e é considerado um intercalador. Moléculas orgânicas podem ligar-se ao DNA por interações eletrostática ao longo da cadeia exterior do DNA, por ligação específica à *groove* (Figura 1.3) e por intercalação (Kubar et al., 2005). Contudo, o conceito de intercalação afeta a flexibilidade do ácido nucleico, distorcendo o arranjo de pares de bases, podendo facilitar a introdução de uma outra molécula intercaladora no arranjo de pares de bases (Caramelo-Nunes et al., 2014). Os intercaladores são fármacos e apresentam vantagens do ponto de vista dos seus efeitos mutagénicos, teratogénicos e carcinogénicos (Kubar et al., 2005). Um intercalador derivado de fenantridina, como o brometo de etídio, foi evidenciado na inserção de anéis aromáticos condensados entre dois pares de bases consecutivos (ligação ligeiramente específica de A-T do DNA através de uma interação de empilhamento não covalente e reversível) e a inserção do grupo fenilo na *groove* menor (Figura 1.4) (Kubar et al., 2005; Caramelo-Nunes et al., 2014). Além disso, as ligações de hidrogénio entre o intercalador e o DNA têm uma pequena contribuição para a ligação, sugerindo que o termo hidrofóbico tem um papel importante na ligação.

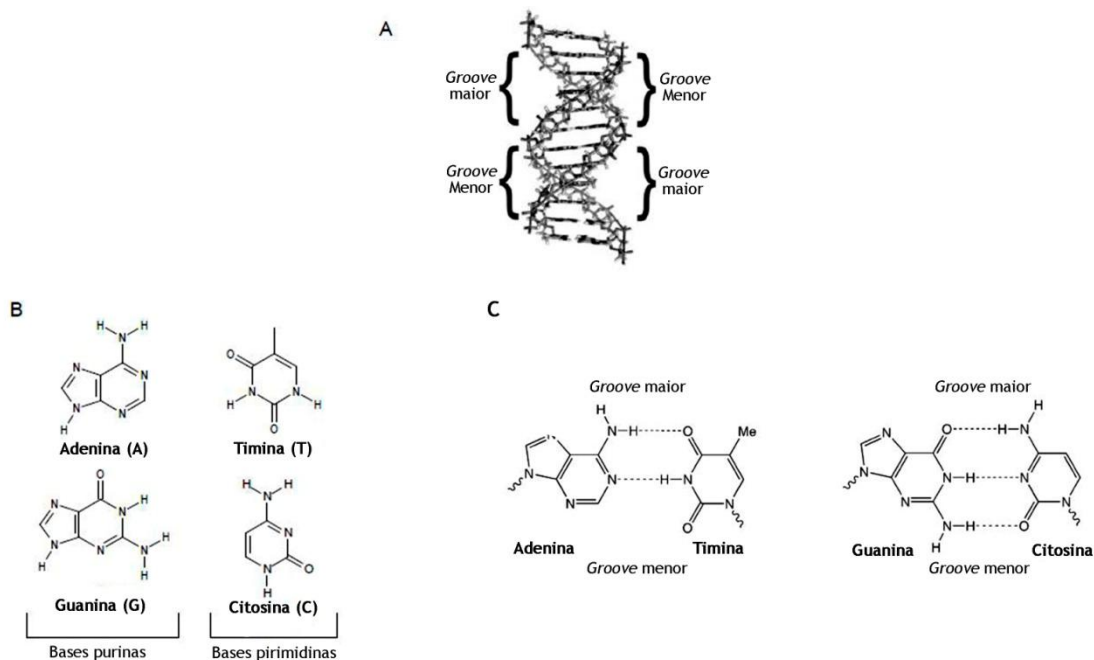


Figura 1.3 - Estrutura básica 3D do DNA e as interações de bases: **(A)** Representação da estrutura dupla-hélice de DNA; **(B)** Bases purinas (A e G) e pirimidinas (T e C); **(C)** Interações complementares dos pares de bases (ligações de hidrogénio) (Adaptado de Hannon, 2007; Neto e Lapis, 2009).

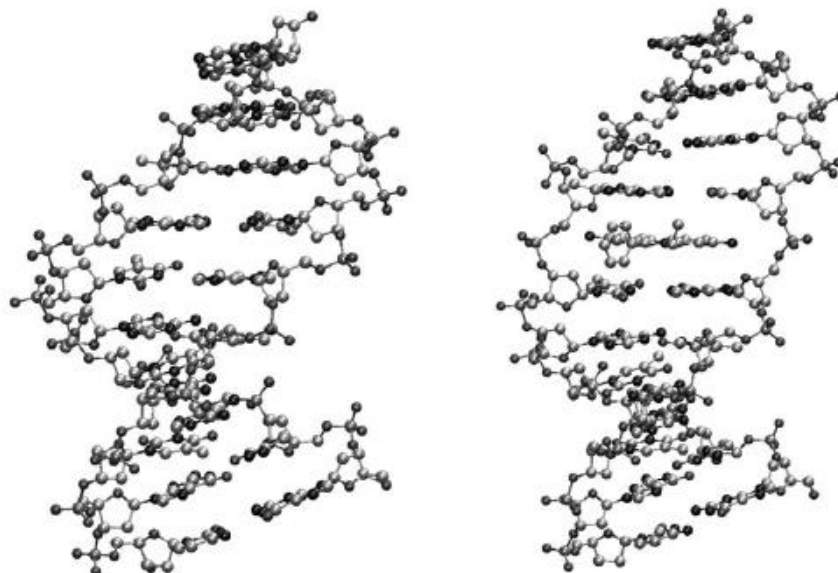


Figura 1.4 - Forma B-DNA (GCATATATGC)₂ (esquerda) com uma molécula de brometo de etídio intercalada (direita) (Adaptado de Kubar et al., 2005).

O DAPP é um derivado de fenantridina (composto heterocíclico com nitrogênio formado por três anéis aromáticos), e é um análogo não quaternário do brometo de etídio (Caramelo-Nunes et al., 2011, 2014). Este apresenta no núcleo fenantridina, dois grupos amina e um grupo fenilo, e quando protonado liga-se mais fortemente ao DNA de cadeia dupla por interações eletrostáticas, do que na forma neutra (empilhamento π - π), quer no estado livre (Kubar et al., 2005) ou imobilizado sobre uma matriz de *Sepharose*[®] (Caramelo-Nunes et al., 2013a). Quando o DAPP está ligado a uma matriz de *Sepharose*[®], a interação eletrostática DAPP-DNA varia com as alterações de pH (5, 6, 7,4 e 8). Foi observada uma maior retenção das isoformas de pDNA a pH 5, diminuindo gradualmente ou sem qualquer retenção com o aumento de pH. Estas variações foram observadas pelas alterações de cor do suporte (Caramelo-Nunes et al., 2013a). O pH e a presença de sal afetam a estabilização do DAPP-DNA, destabilizando complexos previamente formados (Misra e Honig, 1995).

O suporte *DAPP-Sepharose*[®] foi testado em diversas condições cromatográficas. Após o equilíbrio da coluna com tampão de acetato de sódio 10 mM, a pH 5 e a temperatura de 26 °C, sem sal, todas as isoformas de pDNA foram retidas no suporte (devido às fortes interações eletrostáticas). A adição de sal ao tampão levou à eluição das isoformas, sendo possível separar a sc da oc e ln (Caramelo-Nunes et al., 2013a).

Este suporte foi também aplicado na purificação de plasmídeos de diferentes tamanhos (pVAX1-*LacZ* e pCAMBIA-130) a partir de lisados celulares (Caramelo-Nunes et al., 2013b). A eluição foi realizada em apenas duas etapas sendo possível recolher a fração correspondente ao pDNA sc puro. Desta forma, após a adição de 0,22 M e 0,3 M de cloreto de sódio ao eluente do pVAX1-*LacZ* e do pCAMBIA-1303, respetivamente, verificou-se a eluição simultânea das impurezas (pDNA oc e RNA). Porém, o pDNA sc fortemente ligado elui apenas após o aumento da concentração de cloreto de sódio para 0,55 M. Estes resultados mostram que o *DAPP-Sepharose*[®] tem uma maior afinidade para a isoforma sc do que para as outras espécies na solução de lisado. O efeito da diminuição da temperatura para 3 °C e 15 °C na purificação de pDNA também foi estudada com este suporte cromatográfico. Contudo, os resultados mostram que o suporte perde a sua capacidade para separar o RNA do pDNA a 3 °C, enquanto que a 15 °C foram mais semelhantes aos obtidos à temperatura de 26 °C. Verificou-se que o rendimento de recuperação da isoforma sc do plasmídeo pVAX1-*LacZ* (94%) foi maior que a do pCAMBIA-1303 (65%). Este suporte cromatográfico tem alta afinidade uma vez que apresenta um valor de constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de $2,29 \pm 0,195 \times 10^{-7}$ M (Caramelo-Nunes et al., 2013b).

Partindo deste pressuposto, sintetizaram-se os seguintes compostos: ligandos A, B, C e D. Estes ligandos têm estruturas químicas similares ao DAPP, constituídas por anéis aromáticos e cadeias alifáticas incorporando átomos doadores (nitrogénios). Desta forma pretende-se estudar as interações entre estes ligandos e as isoformas do pDNA para posterior imobilização e utilização dos suportes para purificação de pDNA utilizando a AC. Estes ligandos apresentaram uma nova abordagem e inexplorada acerca das interações envolvidas com as isoformas do pDNA. A síntese dos ligandos A, B e C foi realizada através da condensação de

naftaleno-1-carbaldeído (composto aromático benzenóide contendo dois anéis benzênicos) com diferentes aminas como: a tris (2-aminoetil) amina (*tren*), a dietilenetriamina e a 3,3'-diamino-N-metil-dipropilamina, respetivamente numa proporção de 1:3, 1:0,2 e 1:0,3, respetivamente, formando uma imina. Essa imina foi reduzida com borohidreto de sódio em etanol (Cho e Kang, 2005). De forma análoga ao ligando A, a síntese do ligando D foi através da condensação 3-piridinacarbaldeído (composto heterocíclico contendo nitrogénio) com excesso de *tren* seguida por redução. A poliamina tripodal *tren* utilizada na síntese do ligando A e D, apresenta quatro locais de coordenação e todos os seus braços têm o mesmo comprimento (Hai-yan et al., 2010). A sua estrutura é mais flexível do que os compostos lineares análogos, estando a ser explorados em processos de reconhecimentos (Pedras et al., 2009). Os ligandos sintetizados (A, B, C e D) e o DAPP comercial estão representados na figura 1.5.

Este trabalho apresenta outra estratégia de estudo, apostando na síntese química de novos ligandos de afinidade e simultaneamente explora técnicas de *screening* que permitem determinar as interações/afinidade com nucleótidos e pDNA, para posterior seleção do ligando a ser imobilizado na matriz.

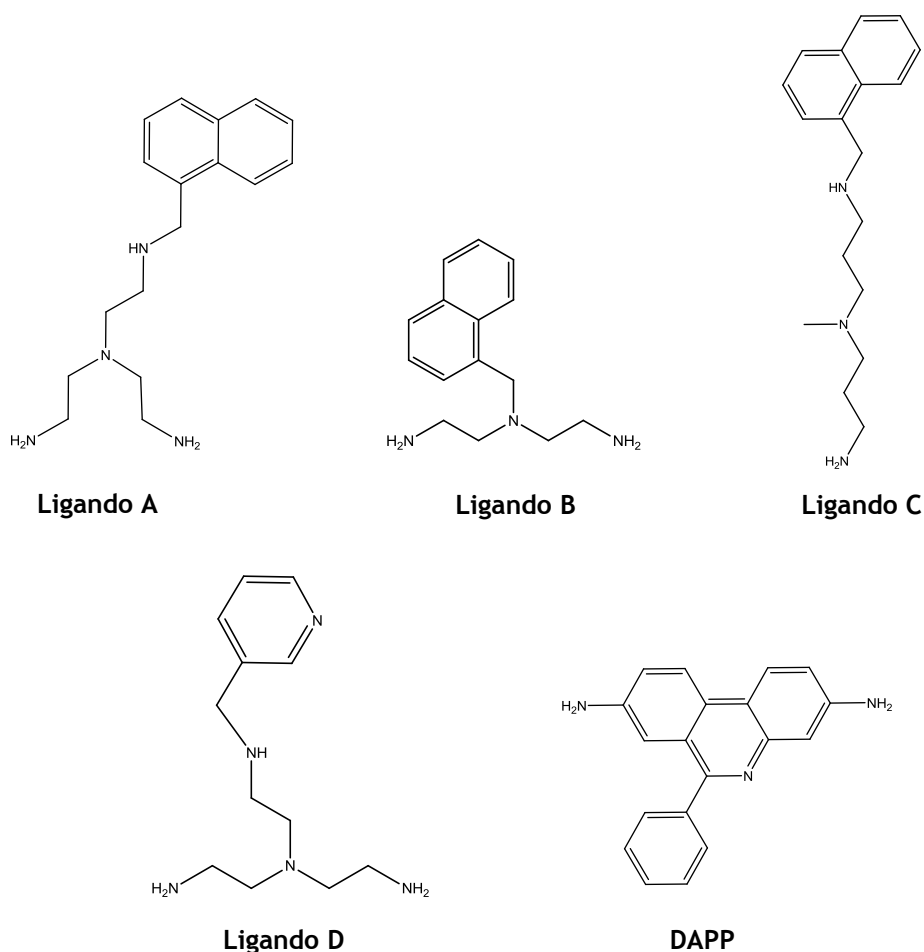


Figura 1.5 - Estruturas químicas dos ligandos aromáticos utilizados neste trabalho (formas não protonadas).

1.2.1.4 - Técnicas de análise de interação ligandos-DNA plasmídico

As técnicas utilizadas neste estudo para analisar as interações entre os ligandos A e D e o pDNA foram a RPS utilizando o biossensor ótico Biacore T200 e a RMN, nomeadamente a técnica diferença de transferência de saturação - (RMN-STD).

1.2.1.4.1 - Ressonância Magnética Nuclear-Diferença de Transferência de Saturação

A RMN tem sido frequentemente utilizada para estudar as interações moleculares em solução e o reconhecimento molecular de proteínas ou ácidos nucleicos por ligandos (Viegas et al., 2011). A técnica de RMN-STD baseia-se no efeito nuclear *Overhauser* (NOE) e permite verificar se ligandos de baixo peso molecular interagem com uma biomolécula e identificam os locais de ligação desses ligandos à biomolécula. (Viegas et al., 2011). Basicamente, uma experiência de STD (Diferença de Transferência de Saturação) envolve a subtração do espectro sem saturação dos prótons da biomolécula (espectro *off-resonance*, com intensidades de sinal I_0), do espectro da biomolécula onde os prótons foram seletivamente saturados (espectro de *on-resonance*, obtida por irradiação de uma região do espectro que contém apenas as ressonâncias da biomolécula com intensidade I_{sat}). No espectro de diferença ($I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$) apenas os sinais dos ligandos que recebem a transferência de saturação da biomolécula (Viegas et al., 2011) terão sinais de STD, e portanto, darão informação acerca da interação do ligando à biomolécula (Figura 1.6). Esta técnica permite identificar os prótons do ligando envolvidos na ligação à biomolécula.

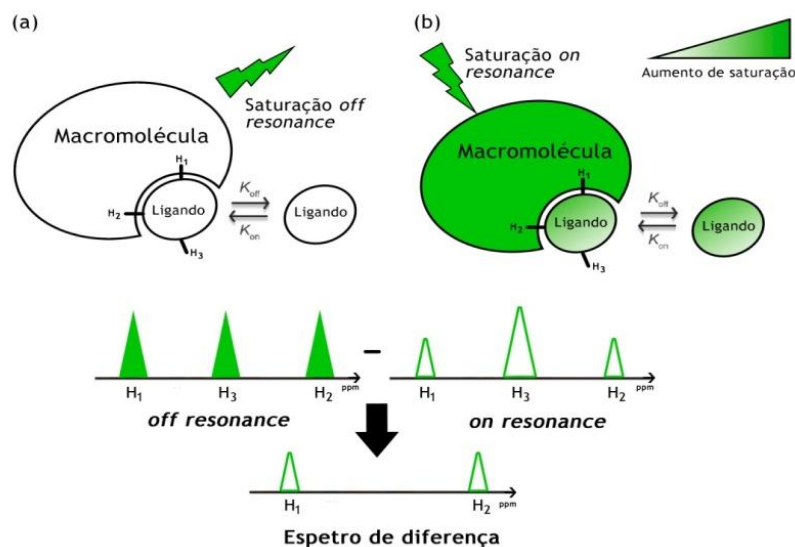


Figura 1.6 - Representação esquemática da experiência de RMN-STD em que o espectro final é obtido pela subtração do espectro de referência (*off resonance*) com o espectro saturado (*on resonance*). (a) Saturação *off resonance*. (b) Saturação *on resonance*. (Adaptado de Viegas et al., 2011; Wagstaff et al., 2013).

Esta técnica de RMN-STD foi aplicada na análise de interações entre L-histidina-*Sepharose*®, (Cruz et al., 2013), L-metionina-*Sepharose*® (Cruz et al., 2012) e nucleótidos/isoformas de plasmídeos, tendo-se verificado uma boa correlação com os resultados obtidos por AC. A interação entre cianinas simétricas e assimétricas e nucleótidos (Cruz et al., 2011a), foi também estudada por RMN-STD como possíveis ligandos de afinidade, verificando-se que determinados grupos funcionais eram específicos de determinados nucleótidos (Cruz et al., 2011b).

A Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico (HR-MAS) RMN foi utilizada para caracterizar estruturalmente os suportes cromatográficos. Esta consiste no *spinning* da amostra no ângulo mágico, e quando combinado com o *swelling* do suporte, normalmente resulta em líquido de alta resolução com espectros de 1D e 2D resolúveis para suspensões (Carvalho et al., 2010).

1.2.1.4.2 - Ressonância Plasmónica de Superfície

A RPS utilizando um biossensor ótico foi utilizada para medir a afinidade, através do cálculo das constantes de dissociação de equilíbrio da interação ligando-pDNA. Permite a análise em tempo real e registo dos perfis de associação/dissociação num sensograma (Figura 1.7). Durante as duas últimas décadas, a técnica de RPS tem sido aplicada a diversos sistemas moleculares, tais como ligação de fármacos a DNA, interações anticorpo-antigénio, interações de hidratos de carbono-RNA, alterações conformacionais de proteínas, entre outros (Bakhtiar, 2013).

Baseia-se nas propriedades óticas e consiste numa oscilação da densidade de carga longitudinal ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas com sinais opostos, onde um é o ouro, e o outro é o vidro. Quando a luz polarizada atravessa o vidro (meio mais denso) e alcança uma interface entre este meio e um meio de densidade ótica menor, é refletida de volta para o meio mais denso ocorrendo reflexão total interna (TIR). Embora a luz incidente seja totalmente refletida internamente, uma componente desta radiação, designada por onda evanescente, entra na interface do meio menos denso. Num determinado ângulo de incidência parte da radiação acopla com os eletrões livres do ouro oscilantes (*plasmons*), ocorrendo a condição de ressonância. Em consequência, ocorre uma perda de energia da luz incidente para o ouro, resultando no deslocamento dependente do tempo na intensidade do "ângulo" refletido da luz polarizada, o qual é detetado num sensograma (gráfico da resposta em unidades de luz, RU (unidades de ressonância) em função do tempo, s (segundos)). Em RPS, a onda evanescente excita os eletrões na camada de ouro, produzindo os *plasmons* de superfície (ondas de superfície eletromagnéticas que se propagam paralelamente à região de interface) (Bakhtiar, 2013). Este fenómeno ocorre na superfície de um sensor chip colocado no sistema microfluídico do biossensor ótico representado na figura 1.7 (a).

Existem comercialmente disponíveis vários tipos de superfícies designadas por sensor chip, tais como, SA, NTA (para aplicações de captura); HPA, L1 (para ligandos hidrofóbicos); C1, Au e SIA Kit Au e CM3, CM4, CM5. O sensor chip CM5 permite imobilizar uma vasta gama de ligandos, desde pequenas moléculas orgânicas até, proteínas, ácidos nucleicos e até mesmo hidratos de carbono (Handbook BSS, 2008). O primeiro passo desta técnica consiste na imobilização do ligando na matriz do sensor chip representado na figura 1.7 (a). A estratégia de imobilização depende da estrutura química dos ligandos, os quais são ligados covalentemente à superfície do sensor chip. No caso do sensor chip CM5, a superfície deve ser previamente ativada por métodos químicos, estando o acoplamento amina representado na figura 1.7 (b)). Este método químico proporciona a ativação dos grupos carboxílicos da superfície do sensor com uma mistura de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) por forma a resultar ésteres de succinimida reativos, sendo estes responsáveis por reagirem com os grupos amina. Deste modo, a imobilização química através de grupos amina deve ser realizada de tal maneira a minimizar a ligações não específicas (Bakhtiar, 2013). Após imobilização do ligando na superfície injetam-se concentrações de analito (neste estudo é o pDNA) na solução do tampão de corrida. Quando o analito interage com o ligando imobilizado, o índice de refração da interface metal-solução sofre alteração.

Alguns autores defendem que a técnica de RPS pode mimetizar a cromatografia de afinidade, visto que há um ligando imobilizado numa matriz e biomoléculas em solução a interagirem na superfície, monitorizando determinadas condições experimentais tais como, força iónica, temperatura, tempo de contacto e velocidade de fluxo (Cruz et al., 2011c).

Consequentemente, alguns trabalhos anteriormente publicados identificaram e quantificaram as ligações estabelecidas, entre suportes cromatográficos com aminoácidos imobilizados, L-lisina-*Sepharose*® (Cruz et al., 2011c), L-arginina-*Sepharose*® (Cruz et al., 2011c) com nucleótidos/isoformas de plasmídeos, a L-lisina-bisoxo-*Sepharose*® (Cruz et al., 2013) com polinucleótidos sintéticos.

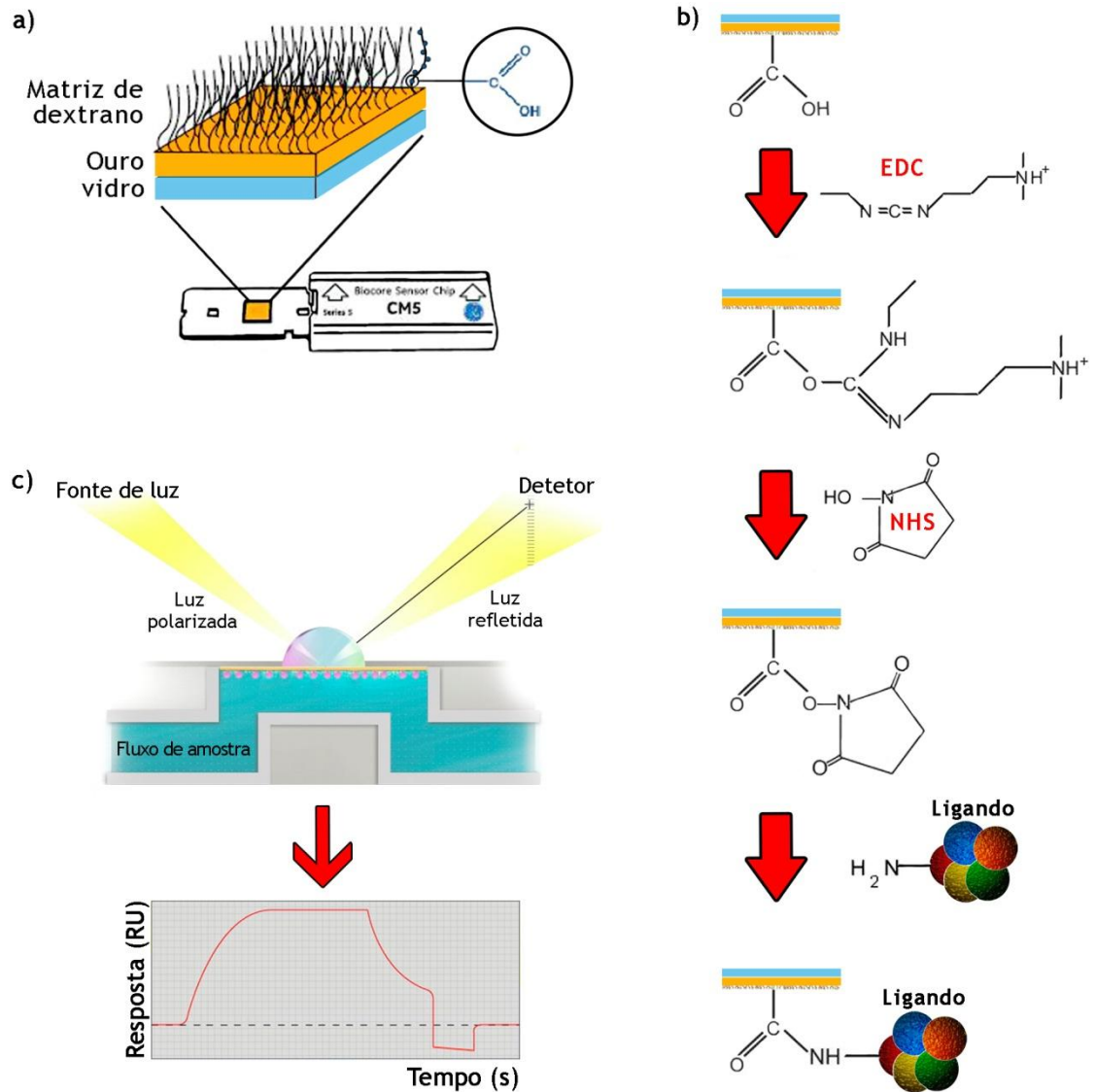


Figura 1.7 - Esquema das etapas da técnica de RPS. **(a)** Esquema ilustrativo da estrutura da superfície de um sensor chip CM5; **(b)** Ativação da matriz de carboximetil dextrano sobre a superfície através de uma mistura de EDC/NHS utilizando o método de imobilização através dos grupos amina dos ligandos; **(c)** Princípio de detecção do RPS, representado num sensograma (Adaptado de Handbook BSS, 2008).

A combinação da técnica RMN-STD e cálculo das constantes de dissociação de equilíbrio por RPS permitiram estabelecer detalhes do processo de reconhecimento molecular ligando/biomolécula. Foi desafiador desenvolver novos suportes de afinidade através da síntese química de novos ligandos, de forma a utilizá-los na purificação de pDNA para fins terapêuticos, com a finalidade de promover o progresso das terapias moleculares.

Capítulo 2 - Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- ✧ Sintetizar ligandos com estrutura química idêntica ao DAPP;
- ✧ Determinar a afinidade entre os ligandos sintetizados/DAPP e as isoformas do plasmídeo (pVAX1-*LacZ*) utilizando a técnica de RPS - biossensor ótico;
- ✧ Sintetizar e caracterizar os suportes cromatográficos através da imobilização do (s) ligando (s) mais promissores na *Sepharose*®;
- ✧ Identificar os locais de ligação dos nucleótidos aos suportes DAPP e ligando A utilizando a técnica de RMN-STD;
- ✧ Comparar as interações entre ligandos/DAPP e pDNA/nucleótidos, e explorar outras condições experimentais que promovam a interação;

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 - Materiais

3.1.1 - Reagentes

Os reagentes utilizados na síntese dos ligandos foram o naftaleno-1-carbaldeído, 95%; tris (2-aminoetil) amina (*tren*), 96%; 3,3'-diamino-N-metildipropilamina, 96%; dietilenotriamina, 99%; 3-piridinacarboxaldeído, 98%, borohidreto de sódio 99 % adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e os solventes diclorometano, 99,99%; 1,4-dioxano, 99,99%; etanol, 99,99% adquiridos pela Fisher (Leicestershire, Reino Unido). Estes reagentes comerciais utilizaram-se sem qualquer purificação adicional. O solvente deuterado utilizado na caracterização dos ligandos por RMN foi a água deuterada (D_2O) adquirida por euriso-top® (St-Aubin Cedex).

Os diferentes nucleótidos utilizados na técnica de RMN-STD foram a adenosina-3'-monofosfato (3'-AMP), 98%; adenosina-5'-monofosfato (5'-AMP), 97%, citidina-5'-monofosfato (5'-CMP), 98%; guanosina-5'-monofosfato de sal disódico hidratado (5'-GMP), 99%; timina-5'-monofosfato de sal disódico hidratado (5'-TMP), 99% adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O 1,4-butanediol diglicidil éter e o intercalador DAPP foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 0,6 M contendo 50 mg de borohidreto de sódio por mL, carbonato de sódio 2 M e a solução 100 mM de tampão fosfato de potássio foram preparadas com água desionizada com grau de ultra-pura, purificada com o sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, EUA). A referência utilizada nos espectros de 1H de RMN foi o ácido 3- (trimetilsilil) propiónico- d_4 (TSP).

Foi utilizado como solvente deuterado na caracterização dos suportes através da técnica de HR-MAS RMN, o clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) adquirido por euriso-top® (St-Aubin Cedex).

Foi utilizada na caracterização de estudos de afinidade dos diversos ligandos a Trizma® base, 99,9%, tampão borato (100 mM, pH 9) adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O kit de imobilização amina contendo NHS, EDC; 1 M de etanolamina-HCl, tampão HBS-EP⁺ (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05 % surfatante P20; 3 mM EDTA); HBS-N (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl); Surfatante P20; Glicina (10 mM, pH 2,5); adquiridos na GE Healthcare, Suécia. As soluções tampões utilizadas, Tris (hidroximetil) metilamina-HCl (Tris-HCl) (10 mM, pH 8,0) e acetato de sódio- CH_3COOH (10 mM, pH 5,0), foram preparadas com água desionizada com grau de ultra-pura, purificada com o sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, EUA).

3.1.2 - Reagentes utilizados na produção e purificação do plasmídeo pVAX1-*LacZ*

A estirpe hospedeira usada para a produção do plasmídeo pVAX1-*LacZ* de 6,05 kpb (Invitrogen, Carlsband, CA, EUA) e os vários ácidos nucleicos foi a *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli* DH5 α) obtida na Invitrogen (Carlsband, CA, EUA). A kanamicina foi adquirida na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O kit de purificação de plasmídeo foi o NZYMaxiprep, da NZYTech (Lisboa, Portugal). O isopropanol (Prolabo®, France), MOPS (Prolabo®, Bélgica), hidróxido de sódio e Triton® X-100 foram adquiridos a partir de Fisher (Leicestershire, Reino Unido). O cloreto de sódio e o ácido tetraacético etileno-diamina (EDTA) foram adquiridos por VWR (Prolabo®, Bélgica). O acetato de potássio foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), o dodecilsulfato de sódio (SDS) a partir da HiMedia® (Mumbai, Índia) e o ácido acético glacial a partir da Chem-Lab (Zedeigem, Bélgica). Todas as soluções foram preparadas com água desionizada com grau de ultra-pura, purificada com o sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, EUA).

3.2 - Equipamentos

Na síntese de ligandos foram necessários equipamentos adequados tais como: placa de aquecimento, Lab-Mix 25 (Heidolph, Fisher, Alemanha); acoplados com sensores de temperatura, EKT Hei-Con (Heidolph, Fisher, Alemanha); evaporador rotativo, Butchi (Labortechnik AG, Suíça), constituído por rotavapor (Rotavapor R-215), por um controlador de vácuo (Vacuum Controller V-850), uma bomba de vácuo (Vacuum Pump V-700) e um banho de água (Heating bath B-491); e a estufa a vácuo de compostos Trade Raypa® (Barcelona, Espanha), bem como todo o material de vidro, borracha ou cortiça inerente à síntese de compostos.

A caracterização dos ligandos foi realizada no espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz (Bruker BioSpin, Alemanha), equipado com uma sonda BBFO 1 utilizando o *software* TopSpin versão 3.1 e por espectrometria de massa utilizando a técnica ESI MS.

A caracterização das interações dos suportes DAPP e ligando A com os mononucleótidos foi realizada utilizando a técnica RMN-STD e foi efetuada no espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz (Bruker BioSpin, Alemanha), equipado com a criosonda QCI utilizando o *software* TopSpin versão 3.1.

A técnica HR-MAS RMN permitiu caracterizar o suporte do ligando A e os espectros foram adquiridos no espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz equipado com a sonda HR-MAS RMN com três canais.

As fermentações para obter cópias de *E. coli* DH5 α portadora de pVAX1-LacZ foram realizadas nos seguintes equipamentos: incubadora Binder (Tuttlinger, Alemanha) para proporcionar o crescimento de *E. coli* DH5 α numa placa de inoculação com Luria-Bertani agar (LBagar) suplementado com 30 μ g/mL de kanamicina, agitador orbital Agitorb 200 (Aralab, Portugal) utilizado para o crescimento adequado da *E. coli* DH5 α e a centrífuga Allegra® X-22 (Beckman Coulter, USA) utilizada para a obtenção dos pellets bacterianos necessários ao processo de lise celular efetuado posteriormente.

Os equipamentos utilizados na lise alcalina foram: Vortex MIXER 230 V (Labnet, Edison, NJ USA) utilizado na ressuspensão dos pellets bacterianos e a centrífuga Allegra™ 25R (Beckman Coulter, Alemanha) de forma a remover restos celulares e a formação do plasmídeo pVAX1-LacZ.

A concentração de pDNA foi determinada por espectrofotometria de luz ultravioleta (UV) com Ultrospec® 3000/Espectrofotómetro visível (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). Os ensaios de RPS foram realizados no Biacore T200 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) utilizando um sensor chip CM5 revestido com carboximetil dextrano. A imobilização dos ligandos na superfície do chip CM5 foi realizada através do *kit amino coupling* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), constituído por EDC, NHS e 1 M etanolamina-HCl, tampão HBS-EP⁺ e surfatante P20. A solução de regeneração utilizada foi glicina-HCl (10 mM pH 2,5) (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

As isoformas do pDNA foram liofilizadas no sistema de CoolSafe™ 110-4Pro (Scanvac, Dinamarca), uma vez que estas foram ressuspendidas em água desionizada com grau de ultra-pura, purificada com um sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, EUA).

3.3 - Métodos

3.3.1 - Síntese e caracterização dos ligandos e suportes

3.3.1.1 - Síntese do ligando A

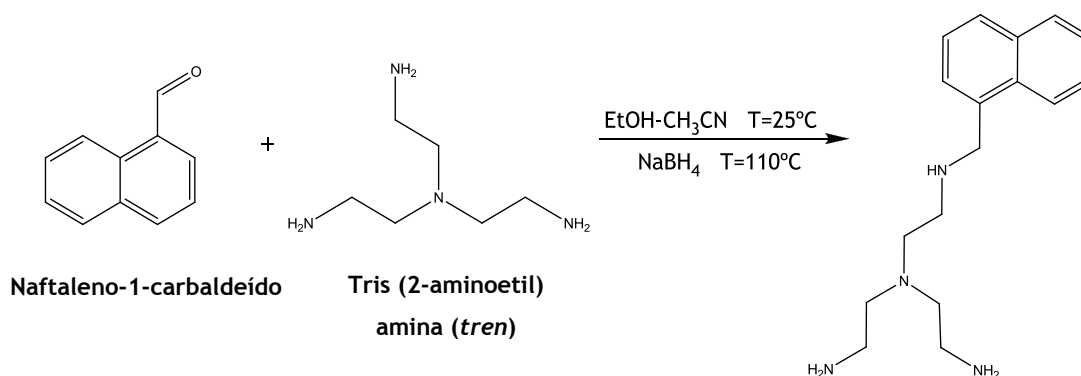


Figura 3.1 - Síntese do ligando A (Clares et al., 2004; Carbonell et al., 2013).

O naftaleno-1-carbaldeído ($6,4 \times 10^{-3}$ mol; 1 g) foi dissolvido com *tren* ($19,2 \times 10^{-3}$ mol; 2,80 g) numa solução de etanol-acetonitrilo seco (1:1) durante ± 67 horas. Os dois reagentes foram pipetados com uma micropipeta de 1000 μ L e introduzidos diretamente para o balão de 250 mL de fundo redondo com duas tubuladuras. Após a agitação, verifica-se uma tonalidade amarela no interior do balão. O solvente foi evaporado e posteriormente adicionou-se 20 mL de etanol 99,9 %. Em seguida, foi adicionado o borohidreto de sódio ($5,97 \times 10^{-2}$ mol; 2,26 g) e a solução foi colocada em refluxo durante ± 5 horas, tendo-se observado efervescência. Procedeu-se a uma filtração para remover o excesso do borohidreto de sódio, seguindo-se a evaporação do solvente e a sua secagem (55 °C, -0,6 bar) na estufa de vácuo. O resíduo foi tratado com água destilada e extraído com diclorometano (3 x 50 mL) utilizando uma ampola de decantação de 250 mL. Procedeu-se a uma filtração sob pressão reduzida. Evaporou-se o solvente e procedeu-se à secagem do óleo. O óleo apresentou cor verde. De maneira a precipitar o composto puro, adicionou-se um volume mínimo de etanol 99,9 % e gotas de ácido clorídrico 37 % com o auxílio de uma pipeta de *pasteur* de vidro. Como não se obteve precipitado, seguiu-se a evaporação do solvente. Por conseguinte, o resíduo foi tratado com a mistura de solventes etanol-metanol (1:1), obtendo-se um precipitado branco. Evaporou-se e secou-se o sólido branco (1,20 g, rendimento = 66 %).

Caracterização:

^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 8,04 (multiplete, 3H, 130,71); 7,61 (multiplete, 4H, 129,79); 4,65 (singleto, 1H, 48,18); 3,26 (triplete, 2H, $J=7,12$ Hz, 43,92); 3,02 (triplete, 2H, $J=6,70$ Hz, 36,37); 2,86 (triplete, 2H, $J=7,12$ Hz, 48,49); 2,78 (triplete, 2H, $J=6,70$ Hz, 49,79) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, D_2O): δ 133,65; 130,93; 130,71; 129,79; 129,21; 127,54; 126,79; 126,29; 125,62; 122,49; 49,79; 48,49; 48,19; 44,03; 36,53 ppm.

Os espectros correspondentes ao *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT135), DEPT90, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (HSQC) e $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ *Heteronuclear Multiple-bond Correlation* (HMBC) encontram-se no anexo I.

MS (ES⁺): m/z calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4$ é de 286,42, foi encontrado a 287,22 [M + H]⁺.

3.3.1.2 - Síntese do ligando B

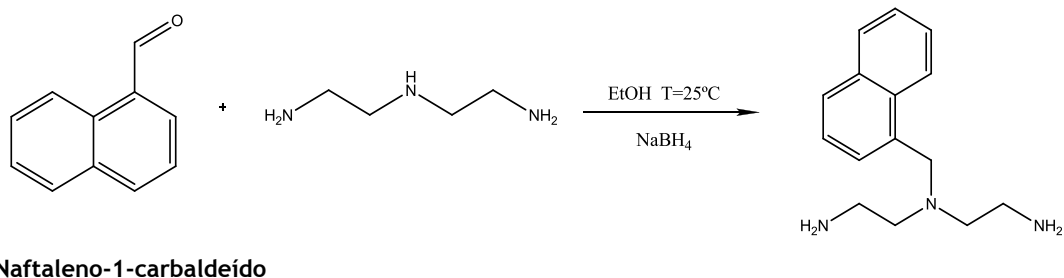


Figura 3.2 - Síntese do ligando B (Carbonell et al., 2013).

De acordo com o estudo realizado por Clares et al, 2004, a síntese deste ligando foi efetuada à temperatura ambiente e sob agitação constante, dissolvendo-se o naftaleno-1-carbaldeído ($6,4 \times 10^{-3}$ mol; 1 g) e a dietilenetriamina ($1,92 \times 10^{-3}$ mol; 0,198 g) em etanol 99,9 % durante \pm 17 horas num balão de 250 mL. Em seguida, foi adicionado muito lentamente o borohidreto de sódio ($5,95 \times 10^{-2}$ mol; 2,25 g) e deixou-se em agitação durante 2 dias, tendo-se observado efervescência em etanol 99,9 %. Após 2 dias, verificou-se uma tonalidade incolor/turvo no balão da reação. Procedeu-se à filtração de modo a remover o excesso de borohidreto de sódio que não reagiu. Evaporou-se o solvente, verificando-se a formação de um sólido branco. Adicionou-se posteriormente, 60 mL de etanol 99,9 % ao sólido, seguindo-se, da sua agitação constante. Adicionou-se gota-a-gota ácido clorídrico 37 %. Quando o pH da solução era cerca de 6, ocorreu a formação de um precipitado branco. Posteriormente, procedeu-se a uma filtração sob pressão reduzida e secou-se na estufa de vácuo. Obteve-se 3,68 g de um produto branco.

Caracterização:

^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 8,03 (multiplete, 3H,130,80); 7,59 (multiplete, 4H,129,17); 4,77 (singleto, 2H, 48,58); 3,51 (triplete, 2H, $J=6,68$ Hz, 43,63); 3,41 (triplete, 2H, $J=6,68$ Hz, 43,46) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, D_2O): δ 133,63; 130,80; 130,71; 129,68; 129,17; 127,60; 126,81; 126,10; 125,69; 124,02; 122,52; 48,58; 43,63; 43,46 ppm.

Os espetros correspondentes ao DEPT135, Espectro bidimensional de correlação ^1H - ^1H (COSY) e $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC encontram-se no anexo II.

MS (ES+): m/z calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3$ é de 243,35, foi encontrado a 244,18 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

3.3.1.3 - Síntese do ligando C

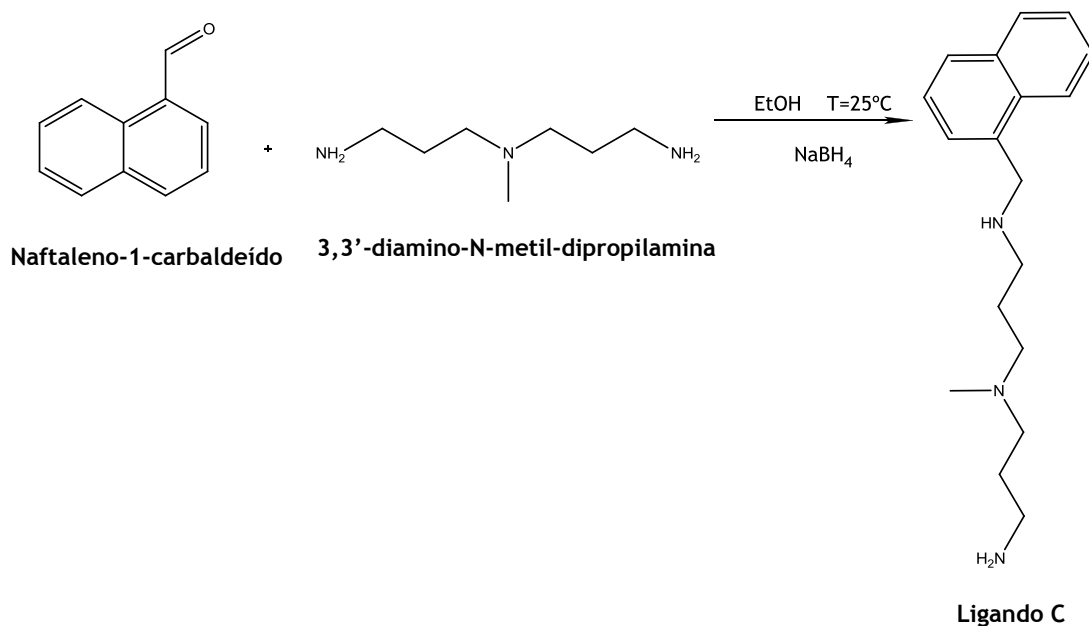


Figura 3.3 - Síntese do ligando C (Carbonell et al., 2013).

Dissolveu-se num balão de 250 mL, o naftaleno-1-carbaldeído ($6,4 \times 10^{-3}$ mol; 1 g) e a 3,3'-diamino-N-metil-dipropilamina ($1,92 \times 10^{-3}$ mol; 0,279 g) em 100 mL de etanol 99,9 % durante \pm 43 horas. A solução apresentou cor amarela claro. Em seguida, adicionou-se o borohidreto de sódio ($5,9 \times 10^{-2}$ mol; 2,24 g) e deixou-se em agitação durante 2 dias, tendo-se observado efervescência em etanol 99,9 %. Após os 2 dias, verifica-se uma tonalidade incolor/turvo no balão da reação. O restante procedimento foi efetuado de igual forma como referenciado em 3.3.1.2. Procedeu-se a uma filtração sob pressão reduzida e secou-se o sólido na estufa a vácuo tendo-se obtido 1,02 g de composto branco (rendimento = 56 %).

Caracterização:

¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 8,07 (duplete, 2H, J=8,25 Hz, 122,56); 7,99 (triplete, 4H, J=7,63 Hz, 130,66); 7,6 (multiplete, 2H, 129,18); 3,18 (multiplete, 2H, 44,28); 2,79 (singlete, 2H, 39,78); 2,10 (triplete, 4H, J=6,56 Hz, 21,02) ppm.

¹³C RMN (400 MHz, D₂O): δ 133,65; 130,88; 130,66; 129,63; 129,18; 127,57; 126,77; 126,41; 125,69; 122,56; 53,04; 48,28; 44,28; 39,78; 21,02 ppm.

Os espectros correspondentes ao DEPT135, DEPT90 e ¹H/¹³C HSQC encontram-se no anexo III.

MS (ES⁺): *m/z* calculado para C₁₈H₂₇N₃ é de 285,43, foi encontrado a 286,22 [M + H]⁺.

3.3.1.4 - Síntese do ligando D

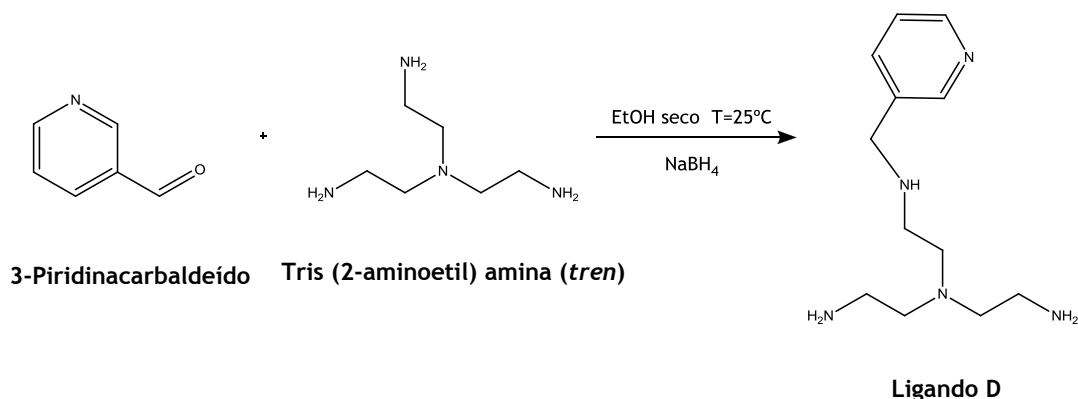


Figura 3.4 - Síntese do ligando D (Carbonell et al., 2013).

Num balão 250 mL misturou-se 3-piridinacetaldeído ($4,7 \times 10^{-3}$ mol; 0,5 g) e *tren* ($14,1 \times 10^{-3}$ mol; 2,06 g) em 75 mL de etanol seco durante 2 horas. Após a agitação, a solução apresentava cor amarela. Em seguida, adicionou-se o borohidreto de sódio ($4,23 \times 10^{-2}$ mol; 1,60 g) e esteve em agitação durante 15 horas, apresentando uma cor verde pálido. A solução foi tratada com água destilada e extraída com diclorometano (3 x 50 mL), seguindo-se a evaporação da fase orgânica e secagem (55°C , -0,6 bar). O óleo obtido apresentou cor verde. O composto foi precipitado no volume mínimo de etanol 99,9 %, e 1,4-dioxano com a adição de algumas gotas de 37% ácido clorídrico. Por fim, secou-se, tendo obtido 0,24 g de um sólido branco (rendimento = 22 %).

Caracterização:

^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 9,11 (multiplete, 1H, 148,88); 8,96 (multiplete, 1H, 142,61); 8,90 (multiplete, 1H, $J=1,68$ Hz, 142,30); 8,25 (multiplete, 1H, $J=2,91$ Hz, 127,94); 4,67 (singleto, 1H, 47,57); 3,47 (triplete, 2H, $J=2,52$ Hz, 44,91); 3,24 (triplete, 2H, $J=3,39$ Hz, 36,32); 3,06 (triplete, 2H, 48,93); 3,00 (triplete, 2H, 49,90) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, D_2O): δ 148,88; 142,61; 142,30; 131,02; 127,94; 49,90; 48,93; 47,57; 44,91; 36,32 ppm.

Os espectros correspondentes ao DEPT135, DEPT90, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC e $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC encontram-se no anexo IV.

MS (ES+): m/z calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_5$ é de 237,34, foi encontrado a 238,20 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

3.3.2 - Síntese dos suportes

O suporte DAPP-*Sepharose*[®] foi sintetizado de acordo com método descrito por Sundberg e Porath, 1974. Os suportes ligando A-*Sepharose*[®] e ligando D-*Sepharose*[®] foram preparados de acordo com o método descrito anteriormente, à exceção da diferença nas proporções de ligando-*Sepharose*[®] e do valor de pH. Resumidamente, a *Sepharose*[®] CL-6B foi lavada com água desionizada, através de um sistema de filtração sob pressão reduzida. Para 500 mg de *Sepharose*[®] foi adicionado 500 µL de uma solução de hidróxido de sódio 0,6 M contendo 50 mg de borohidreto de sódio e 500 µL de 1,4-butanediol diglicidil éter. A suspensão foi colocada num banho de água com agitação orbital (25 °C, 140 rpm) durante 8 horas. Após as 8 horas, o gel foi lavado com água desionizada no mesmo sistema de filtração.

Após ativação dos grupos OH da *Sepharose*[®] via epóxido, a imobilização dos ligandos foi realizada da seguinte maneira: dissolveu-se 150 mg e 302 mg do ligando A e D, respetivamente, em 8 mL de solução de carbonato de sódio 2 M acertando o valor pH a 9,86 em ambos. Posteriormente, foi adicionado 120 mg e 241 mg de *Sepharose*[®] ativada, respetivamente, à solução preparada anteriormente e incubou-se a 70 °C a 140 rpm durante 16 horas. A *Sepharose*[®] derivatizada foi depois lavada com água desionizada para remover o excesso de ligandos livres e carbonato de sódio. O gel foi guardado a 4 °C.

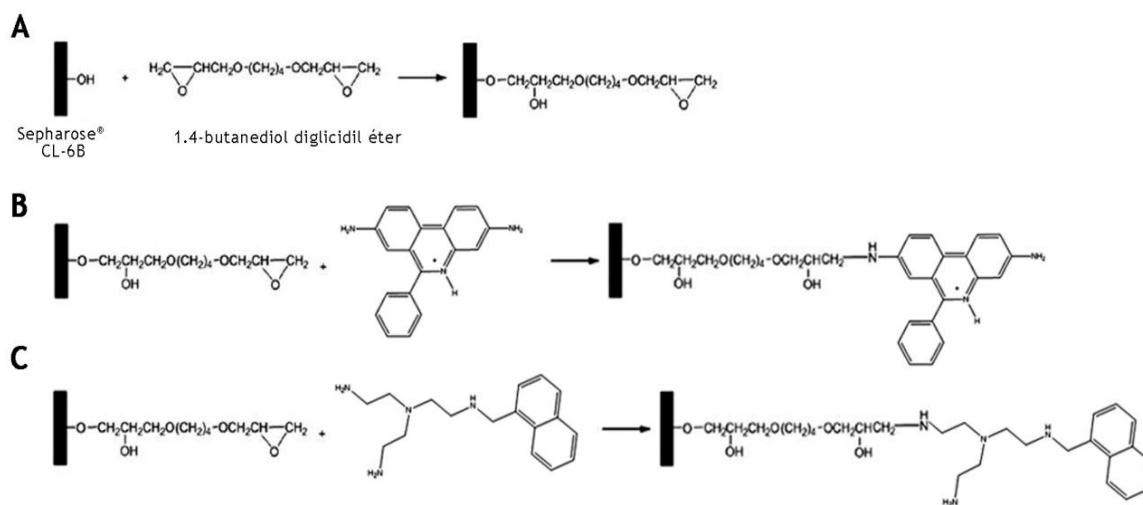


Figura 3.5 - Síntese dos suportes descrito pelo método de Sundberg and Porath, 1974). (A) Ativação dos grupos epóxidos da *Sepharose*[®] CL-6B. (B) Imobilização do DAPP no suporte. (C) Imobilização do ligando A no suporte.

3.3.3 - Produção e Purificação do plasmídeo

3.3.3.1 - Condições de crescimento da *Escherichia coli* DH5 α e plasmídeo

O pDNA utilizado foi o plasmídeo pVAX1-*LacZ* com 6,05 Kpb. O vetor pVAX1-*LacZ* contém o gene codificador de β -galatosidase (*LacZ*). A enzima β -galatosidase catalisa a hidrólise de β -galatósidos, capaz de converter um substrato cromogénico, como o X-Gal (5-bromo-4-cloroindol-3-il- β -D-galatopiranoside), num produto de cor azul (Sousa et al., 2006). A figura 3.6 resume as características deste vetor.

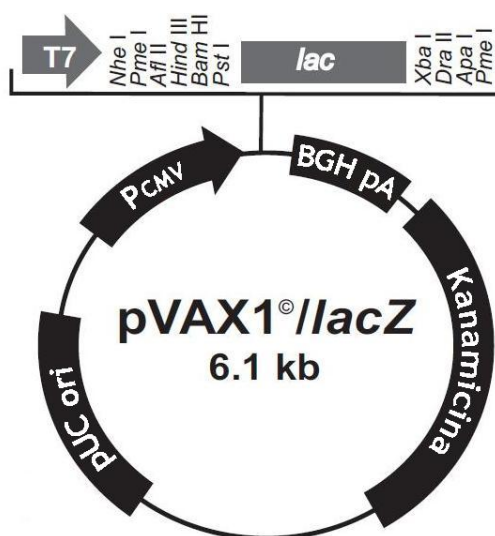


Figura 3.6 - Características do vetor pVAX1-*LacZ* com 6,05 Kpb, contendo um promotor CMV (Citomegalovírus humano), sítio de iniciação T7, sítio de clonagem múltipla, sítio de iniciação *reverse* BGH (Hormona de crescimento bovino), sinal de poli-adenilação BGH, gene de resistência à kanamicina e origem de pUC.

Este plasmídeo foi obtido por fermentação de *E. coli* DH5 α . Após transformação, obtiveram-se várias cópias de plasmídeo enriquecido maioritariamente pela isoforma sc. A pré-fermentação foi realizada a partir de uma placa de inoculação de Luria-Bertani agar (LBagar) suplementado com 30 μ g/mL de kanamicina. Esta placa foi inoculada com *E. coli* DH5 α portadora de pVAX1-*LacZ* pelo método de estrias a 37 °C durante 12 horas.

Após o crescimento de *E. coli* DH5 α , foi inoculado num erlenmeyer de 500 mL (pré-fermentação) e posteriormente em dois erlenmeyer de 1 L (fermentação) com 625 mL de meio Terrific Broth (TB) (20 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, 4 mL/L de glicerol, 0,017 M KH_2PO_4 , 0,072 M de K_2HPO_4 suplementado com 30 μ g/mL de kanamicina e cultivada num agitador rotativo a 37 °C e a 250 rpm sob condições aeróbias. O crescimento celular foi avaliado através da medição da densidade ótica do meio de cultura a um comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}).

Recolheu-se um determinado volume da pré-fermentação, quando esta atingiu a fase exponencial de crescimento, ou seja, cerca de 3-4 horas de cultivo ($DO_{600} \approx 2,5$). Para executar a fermentação, foi retirado do meio TB da pré-fermentação uma quantidade apropriada, de modo a iniciar todas as culturas com uma DO_{600} de aproximadamente 0,2, sob as mesmas condições de agitação e temperatura durante $\approx 8-9$ horas. O crescimento bacteriano foi suspenso quando estas atingiram a fase logarítmica ($DO_{600} \approx 8-9$). O meio de cultura foi transferido para falcons de 50 mL e as células foram recuperadas por centrifugação a 4500 rpm durante 30 min a 4 °C através da centrífuga Allegra® X-22. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets bacterianos foram armazenados a -20 °C.

3.3.4 - Lise alcalina celular e produção de pVAX1-LacZ

A purificação do pVAX1-LacZ para os ensaios com as diferentes isoformas foi realizada utilizando um kit de purificação com colunas com uma resina dietilaminoetanol (DEAE) modificada, carregada positivamente (NZYMaxiprep). Estas permitem uma forte ligação de moléculas de pDNA sendo apenas eluído em condições elevadas de sal, enquanto que, as impurezas são eluídos em condições mais suaves de sal (Diogo et al., 2005).

Os pellets bacterianos foram descongelados e ressuspensos em 20 mL de 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, com 100 µg/mL de RNase A a 4 °C. A lise alcalina foi realizada adicionando cuidadosamente 10 mL de NaOH a 200 mM, 1 % (w/v) de SDS. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, os contaminantes celulares (gDNA e proteínas) foram precipitadas pela adição cuidadosa de 10 mL a solução de acetato de potássio 3 M, pH 5,5 a 4 °C, seguidos de incubação em gelo durante 20 minutos. O precipitado foi removido por centrifugação a 20000 × g durante 30 minutos a 4 °C, utilizando uma centrífuga Allegra™ 25R. Procedeu-se a um segundo passo de centrifugação realizada durante 15 minutos sob as mesmas condições.

Após a lise, a ligação de pDNA para a resina de troca aniónica do kit NZYMaxiprep foi promovido em condições de baixo teor de sal e com pH 7,0 (750 mM NaCl, 50 mM de MOPS, 15 % de isopropanol (v/v), 0,15 % de Triton® X-100 (v/v)). Os contaminantes como proteínas, RNA e, sais, foram removidos por lavagem com 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % de isopropanol (v/v), pH 7,0, sendo que o pDNA foi eluído num tampão de alto teor salino (1,25 M de NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15 % de isopropanol (v/v), pH 8,5). Posteriormente, o pDNA foi concentrado através de uma precipitação pela adição de 0,7 volumes de isopropanol a -20 °C, seguidos de incubação em gelo durante 20-30 minutos. Após o tempo de incubação, centrifugou-se numa centrífuga Allegra™ 25R a 15000 × g durante 30 minutos e a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco durante 5-10 minutos à temperatura ambiente, sendo ressuspensado num volume apropriado de tampão de acordo com os estudos posteriores. Finalmente, as absorvâncias das amostras (Abs_{260nm} e Abs_{280nm}) foram determinadas usando o espectrofotómetro Ultrospec® 3000 para avaliar a quantidade e pureza de pDNA. As amostras de pDNA foram armazenadas a -80 °C.

3.3.5 - Isolamento das isoformas do pDNA

3.3.5.1 - Isoforma sc

De modo a otimizar a quantidade e a qualidade da isoforma sc, a fermentação foi suspensa na fase exponencial ($DO_{600} \sim 5$), reduzindo o tempo de fermentação para 5 horas. A isoforma sc foi purificada depois de efetuada a lise celular alcalina, utilizando o kit NZYMaxiprep usando soluções apropriadas de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, alguns autores (Sousa et al., 2005) sugerem que ao obter-se a isoforma sc intata e não danificada pode dar origem à isoforma oc ou linear por clivagem aleatória de uma ou duas cadeias opostas, respetivamente.

3.3.5.2 - Isoforma oc

Para a obtenção da isoforma oc foi preparada a incubação de uma amostra pDNA sc à temperatura 20-25 °C. A amostra foi analisada ao longo do tempo por eletroforese em gel de agarose 1 % até se observar a conversão total da isoforma sc em isoforma oc (cerca de 3 dias). As amostras foram armazenadas a -80 °C.

3.3.5.3 - Isoforma ln

A preparação de amostra pVAX1-LacZ ln foi realizada por digestão enzimática com Hind III (Takara Bio, Shiga, Japão). As amostras respetivas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora, de acordo com o protocolo comercial. A linearização do plasmídeo foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1 % tendo-se obtido uma banda a 6050 pb. As amostras foram armazenadas a -80 °C.

3.3.6 - Eletroforese em gel de agarose

A identificação das diferentes isoformas de plasmídeos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1 %. As amostras de pDNA conseguidas a partir de cada lise celular alcalina foram analisadas por eletroforese horizontal, utilizando 15 cm de gel de agarose (Hoefer, San Francisco, CA, USA) coradas com *GreenSafe* (1 µg/mL) e visualizadas sob UV num sistema Vilber Lourmat (ILC Lda, Lisboa, Portugal). O gel de agarose foi efetuado em tampão ácido tris-acético (TAE) (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA, pH 8,0) a correr a 100 Volts (V) durante 40 minutos. Por último, as bandas correspondentes às diferentes topologias

de pDNA foram visualizadas sob luz UV através do marcador de peso molecular de DNA Hyper Ladder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

3.3.7 - Estudo das interações ligandos-pDNA

3.3.7.1 - Técnica RMN-STD

Os mononucleótidos (3'-AMP), (5'-AMP), (5'-CMP), (5'-GMP) e (5'-TMP) foram dissolvidos em 100 mM tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) com o pH 5,87 com 10% (v/v) de D_2O e concentração de 75 mM, pH 8,30 com 10% (v/v) de D_2O e concentração de 75 mM para o intercalador DAPP e o ligando A, respectivamente. Os suportes DAPP-*Sepharose*[®] e ligando A-*Sepharose*[®] foram suspensos no mesmo tampão. Para tubos de RMN de 5 mm foi transferido 550 μ L mononucleótido + 50 μ L suporte + 10 μ L TSP e 300 μ L mononucleótido + 300 μ L suporte + 10 μ L TSP para o intercalador DAPP e o ligando A, respectivamente, sendo o volume final de 610 μ L. Em cada tubo de RMN há um excesso de cerca 10 equivalentes de mononucleótido em relação ao suporte DAPP e cerca de 6 equivalentes em relação ao suporte do ligando A. As aquisições foram realizadas a 25 °C no espectrometro Bruker Avance III 600 MHz equipado com a criosonda QCI, sendo os espectros processados no *software* TopSpin versão 3.1.

3.3.7.2 - Caracterização do suporte utilizando a técnica de HR-MAS RMN

O suporte ligando A-*Sepharose*[®] foi caracterizado por RMN através por HR-MAS RMN no espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz, equipado com a sonda HR-MAS RMN utilizando um rotor de 50 μ L a 25 °C. Introduziu-se 0,0117 g de amostra do suporte e 50 μ L de $CDCl_3$. A amostra foi colocada no ângulo mágico ($\theta = 57,4^\circ$) e rodou à velocidade de 4,0 kHz. Os espectros foram adquiridos nestas condições e processados no *software* TopSpin 3.1.

3.3.7.3 - Técnica RPS utilizando o biossensor Biacore T200

Todos os ensaios de RPS foram realizados no biossensor Biacore T200 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) utilizando um sensor chip CM5 com uma matriz de carboximetil dextrano. Foram utilizados três chips CM5 de forma a otimizar a imobilização dos ligandos. Os ligandos imobilizados foram: DAPP, ligando A e ligando D. O tampão de imobilização utilizado foi HBS-N (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl), seguido por um período de estabilização da linha de base com este mesmo tampão. Contudo, os ensaios de afinidade foram realizados às temperaturas de 10 °C e 25 °C em que os tampões de afinidade foram Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) e acetato de sódio- CH_3COOH (10 mM, pH 5,0).

3.3.7.3.1 - Imobilização dos ligandos

Os ligandos foram dissolvidos numa solução de tampão borato (100 mM, pH 9). As concentrações dos ligandos eram: 16,6 mM, 2,3 mM, 0,52 mM para o DAPP, ligando A e D, respetivamente. O DAPP foi dissolvido a pH 5,19 próximo do seu ponto isoelétrico (pI), enquanto que, os restantes ligandos A e D o valor do pH foi ajustado para 9,64 e 9,50, respetivamente.

Os ligandos A e D solubilizaram no tampão borato a pH 9,64 e 9,50, respetivamente. Contudo, o DAPP foi o único ligando que não solubilizou totalmente neste tampão a pH 5,19. Deste modo a amostra foi sonicada a 70 °C, pré-centrifugada (10000 x g, 10 min) e filtrada através de filtros de membrana microporosa de polietersulfona de 0,2 µm desgaseificada a vácuo (Nalgene, Rochester, NY, EUA) e utilizado à temperatura ambiente.

O biossensor Biacore T200 possui um sistema microfluidico que permite, após introdução e normalização do sensor chip, ter 4 células de fluxo independentes onde se conseguem imobilizar 3 ligandos diferentes, deixando a célula de fluxo 1 como referência (sem imobilizar ligando). O chip CM5 foi normalizado com HBS-N.

A matriz de carboximetil dextrano existente na superfície do sensor chip CM5 foi ativada pelo método amina a 25 °C com uma mistura 1:1 de 0,4 M EDC e de 0,1 M NHS. O tempo de contacto dos ligandos com a superfície foi de 7 minutos e velocidade de fluxo utilizada foi 2 µL/min. Esta ativação dos grupos carboxilo originou ésteres de succinimida reativos. Após a ativação injetou-se as soluções dos ligandos, DAPP (16,6 mM, pH 5,19), ligando A (2,3 mM, pH 9,64) e ligando D (0,52 mM, pH 9,50) nas células de fluxo 2,3 e 4, respetivamente. Por fim, injetou-se a 1 M etanolamina-HCl para desativar os restantes grupos ativos na superfície e remover o ligando não ligado covalentemente, seguido de injeção de HBS-EP⁺ para estabilizar a linha de base. Os valores de imobilização dos ligandos nas células de fluxo 2, 3 e 4 foram: 392,9 RU, 1012,5 RU e 364,9 RU para o DAPP, ligando A e D, respetivamente.

A célula de fluxo 1 (referência) foi ativa e bloqueada da mesma maneira mas não se imobilizou ligando com o objetivo de controlar as ligações não específicas dos analitos.

3.3.7.3.3 - Determinação da afinidade

As experiências de afinidade foram realizadas através da injeção das isoformas sc e ln do pVAX1-*LacZ* a diferentes temperaturas (10 °C e a 25 °C) na superfície do sensor chip CM5. Os tampões de corrida utilizados foram Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e acetato de sódio-CH₃COOH 10 mM, pH 5,0 com velocidade de fluxo de 5 µL/min, tempo contato das isoformas entre 120 s e 420 s) e tempo de dissociação entre 200 s e 450 s. Além disso, foram realizadas subtração das respostas de injeção em branco (tampão de corrida sem isoformas pDNA).

Através desta técnica é possível obter informações essenciais como a especificidade da interação, afinidade de ligação, níveis de ligação e constantes de associação e de dissociação.

As K_D foram determinadas através do ajuste dos dados médios de RU, na região do estado estacionário (300 s a 400 s) a um modelo de afinidade, $R_{eq} = R_{máx} \cdot (1 / (1 + K_D / [A]))$, em que R_{eq} representa a quantidade de analito complexado com o ligando, $R_{máx}$ representa a capacidade máxima de ligação do analito, e $[A]$ é a concentração do analito. Por outro lado, a afinidade é diretamente proporcional a K_A e inversamente proporcional ao K_D . Assim, todos os dados numéricos foram realizados em *software* de Biacore T200 versão 1.0 e *software* BIAevaluation versão 4.1.

3.3.7.3.4 - Regeneração

Alguns sensogramas mostraram a dissociação incompleta das isoformas do pVAX1-LacZ do ligando A pelo que foi necessário aplicar a solução de regeneração glicina-HCl 10 mM pH 2,5 para remover pDNA da superfície do ligando.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1 - Síntese e caracterização dos ligandos

Os ligandos sintetizados (A, B, C e D) resultaram da condensação dos aldeídos, naftaleno-1-carbaldeído e 3-piridinacetaldeído, com as aminas na presença de etanol 99,9 % formando-se as respectivas iminas. Estas foram reduzidas com borohidreto de sódio em etanol como esquematizado na figura 4.1. As etapas de purificação dos ligandos envolveram extração com diclorometano, seguido da precipitação do composto com mistura de solventes em etanol-metanol (1:1) para o ligando A, adição de 1,4-dioxano com algumas gotas em ácido clorídrico 37 % para o ligando D. No entanto, a precipitação dos compostos para o ligandos B e C foi em ácido clorídrico a 37 %.

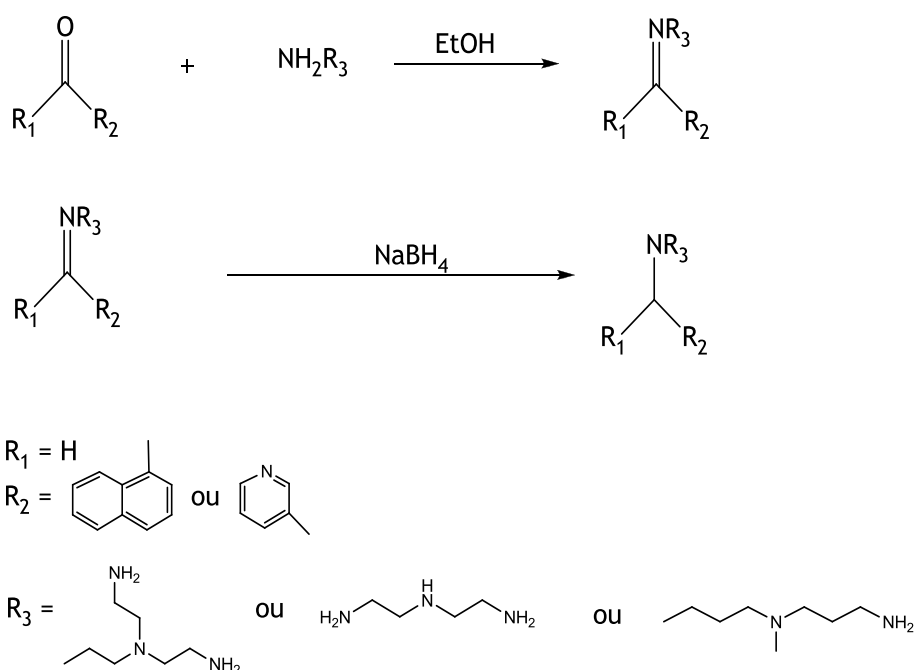
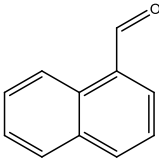
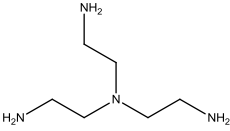
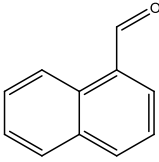
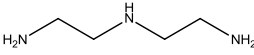
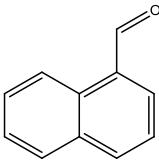
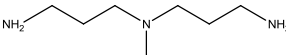
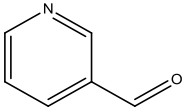
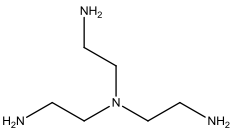


Figura 4.1 - Síntese dos ligandos.

Todos os ligandos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de RMN e espectrometria de massa de alta resolução, apresentada no capítulo 3 - Materiais e Métodos e nos anexos I,II,III e IV.

Na tabela 2 estão representados os reagentes utilizados em cada síntese e o respetivo rendimento, e na figura 4.2 está representada a estrutura química dos compostos sintetizados.

Tabela 2 - Quadro resumo dos reagentes utilizados na síntese e respetivo rendimento.

Ligandos	Aldeído	Amina	Rendimento (%)
A			66
B			> 100 (sais inorgânicos)
C			56
D			22

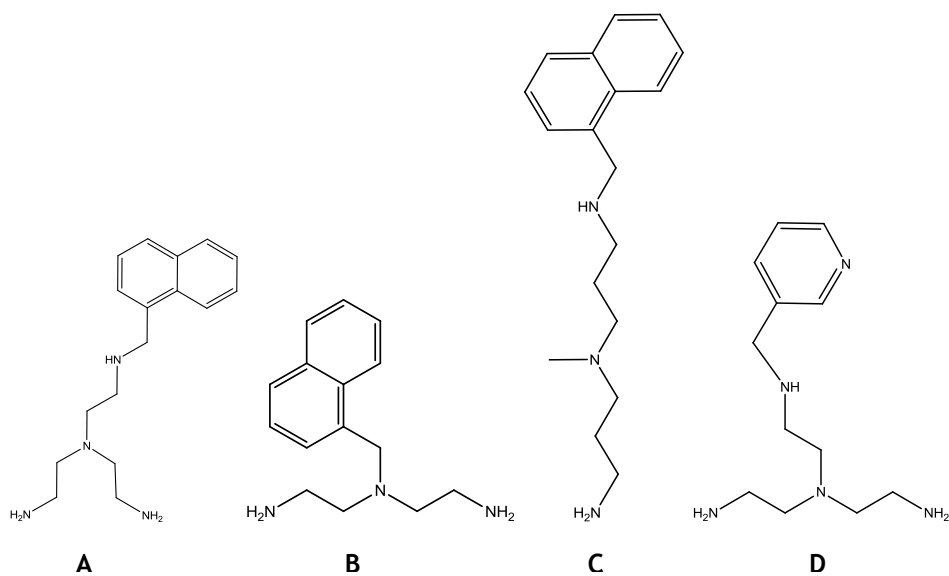


Figura 4.2 - Estrutura química dos ligandos sintetizados, designados por ligandos A, B, C e D, respetivamente.

4.1.1 - Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico

A técnica de HR-MAS RMN permitiu caracterizar estruturalmente os suportes através da ligação dos ligandos à *Sepharose*® CL-6B. O método de imobilização da *Sepharose*® consistiu na transformação dos grupos hidroxilo em grupos epóxidos ativados, seguido da imobilização do ligando pelos grupos amina.

O ligando A foi imobilizado acertando o valor de pH a 9,86, verificando-se um tom amarelado aquando da ligação covalente do ligando à *Sepharose*®. Desta forma, procedeu-se à atribuição dos sinais correspondentes à *Sepharose*® e ao ligando A. Verificou-se a existência do desvio químico dos prótons da *Sepharose*® a 7,5 ppm e 4,1 ppm indicando a ligação do ligando à matriz. Os espectros de HR-MAS RMN estão representados na figura 4.3.

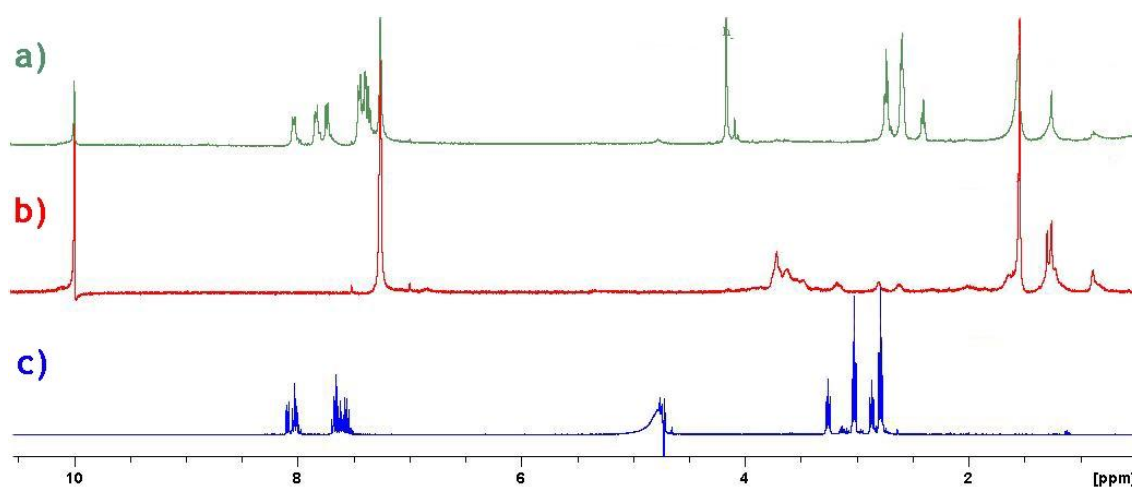


Figura 4.3 - (a) Espectro de ^1H RMN-HR-MAS do ligando A-*Sepharose*®. (b) Espectro de ^1H RMN-HR-MAS da *Sepharose*® ativada. (c) Espectro de ^1H RMN-HR-MAS do ligando A.

Do mesmo modo, a imobilização do DAPP ao suporte foi a pH 5, verificando-se uma cor vermelha intensa, devido à porção fenantridina protonada (Caramelo-Nunes et al., 2013a, 2013b). O suporte DAPP-*Sepharose*® não foi caracterizado por HR-MAS RMN, por este ter sido caracterizado anteriormente com outras técnicas como: Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM), Análise Elementar (EA) e Espectroscopia de Infravermelhos Transformada de Fourier (FT-IR) (Caramelo-Nunes et al., 2013b).

Apesar do suporte ligando D-*Sepharose*® ter sido preparado de forma semelhante ao suporte do ligando A, a imobilização do ligando D covalentemente à *Sepharose*® ativada não foi conseguida, tendo sido o resultado confirmado por HR-MAS RMN. Assim, este não foi estudado por RMN-STD.

4.1.2 - Análise da interação entre os suportes e os mononucleótidos pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação

Com o intuito de avaliar a existência de interação entre os suportes DAPP-*Sepharose*® e ligando A-*Sepharose*® com os 3'- e 5'-mononucleótidos recorreu-se à técnica de RMN-STD (Figura 4.4.). O RMN-STD resulta da diferença entre o espectro de transferência de saturação e o espectro de RMN de referência. À solução de suporte é adicionado 3'- e 5'-mononucleótidos e recolhe-se um espectro de protão onde o suporte é seletivamente irradiado a uma frequência afastada do sinal mais próximo do mononucleótido (pelo menos 700 Hz), designado por espectro *on-resonance*.

Caso o mononucleótido se ligue ao suporte, ocorre transferência de saturação, dependente do tempo de contacto entre o suporte e o mononucleótido. De seguida, realiza-se uma nova irradiação, para valores de frequência afastados de qualquer sinal (suporte ou mononucleótido) designado de espectro *off-resonance*. Através da subtração do espectro *on-resonance* e o espectro *off-resonance* resulta um espectro contendo unicamente os sinais dos protões do mononucleótido que efetivamente se ligaram ao suporte.

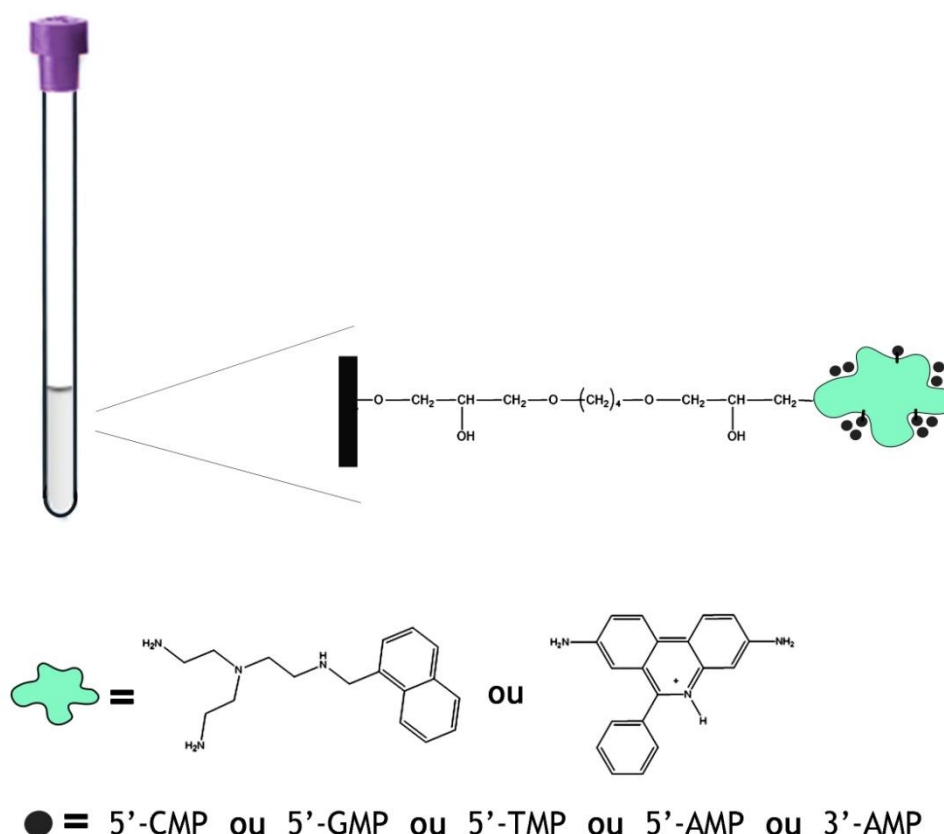


Figura 4.4 - Técnica de RMN-STD onde foram analisados os suportes DAPP-*Sepharose*® e ligando A-*Sepharose*® com os respetivos 3'- e 5'-mononucleótidos num tubo de RMN de 5 mm.

A percentagem de STD para cada próton do mononucleótido foi calculada através da seguinte equação, $(I_0 - I_{STD}) / I_0$, em que $(I_0 - I_{STD})$ é a intensidade do pico no espectro de STD, enquanto que, o I_0 é a intensidade do pico no espectro *off-resonance*. Assim, a intensidade do maior efeito STD foi fixada em 100%, e utilizada como referência.

A identificação dos locais de ligação dos 3'- e 5'-mononucleótidos aos suportes irão esclarecer quais os grupos funcionais preferenciais para ocorrer reconhecimento molecular.

Nas figuras 4.4.1 a 4.4.5 representam-se os espectros de próton de RMN de cada mononucleótido e os espectros de RMN-STD entre os suportes DAPP-*Sepharose*® e ligando A-*Sepharose*® com os mononucleótidos, 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-TMP, 3'-AMP e 5'-AMP, respetivamente.

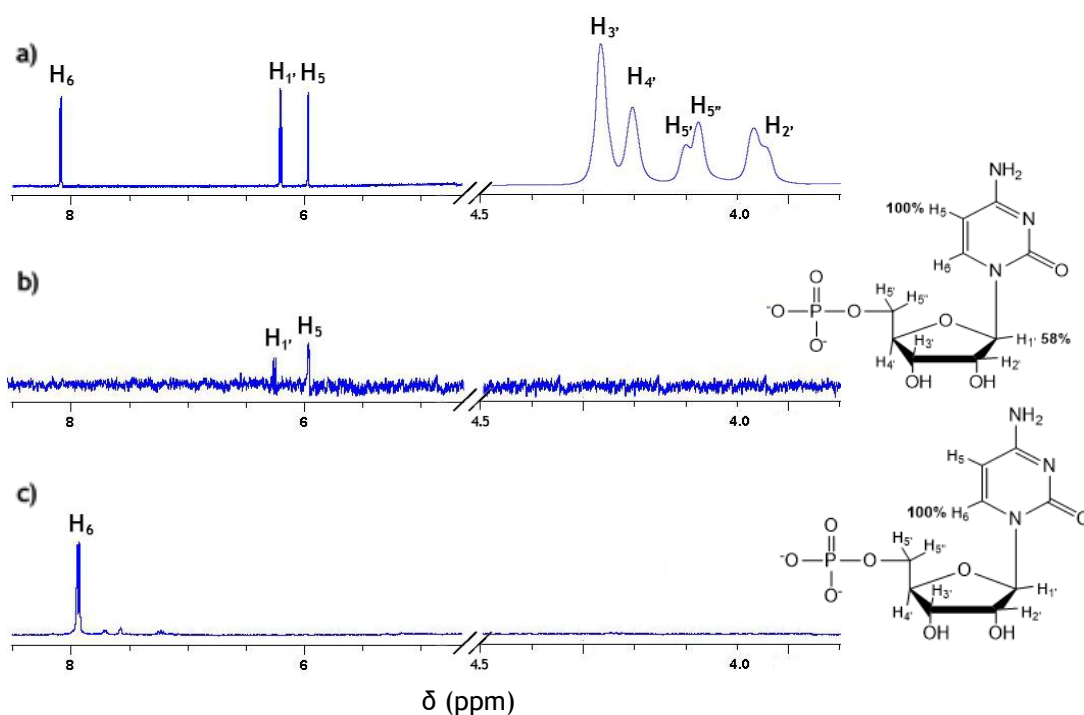


Figura 4.4.1 - Espectros de RMN-STD. (a) Espectro de referência de ^1H RMN do 5'-CMP; (b) Espectro de ^1H RMN-STD do 5'-CMP: suporte DAPP e (c) Espectro de ^1H RMN-STD de 5'-CMP: suporte ligando A.

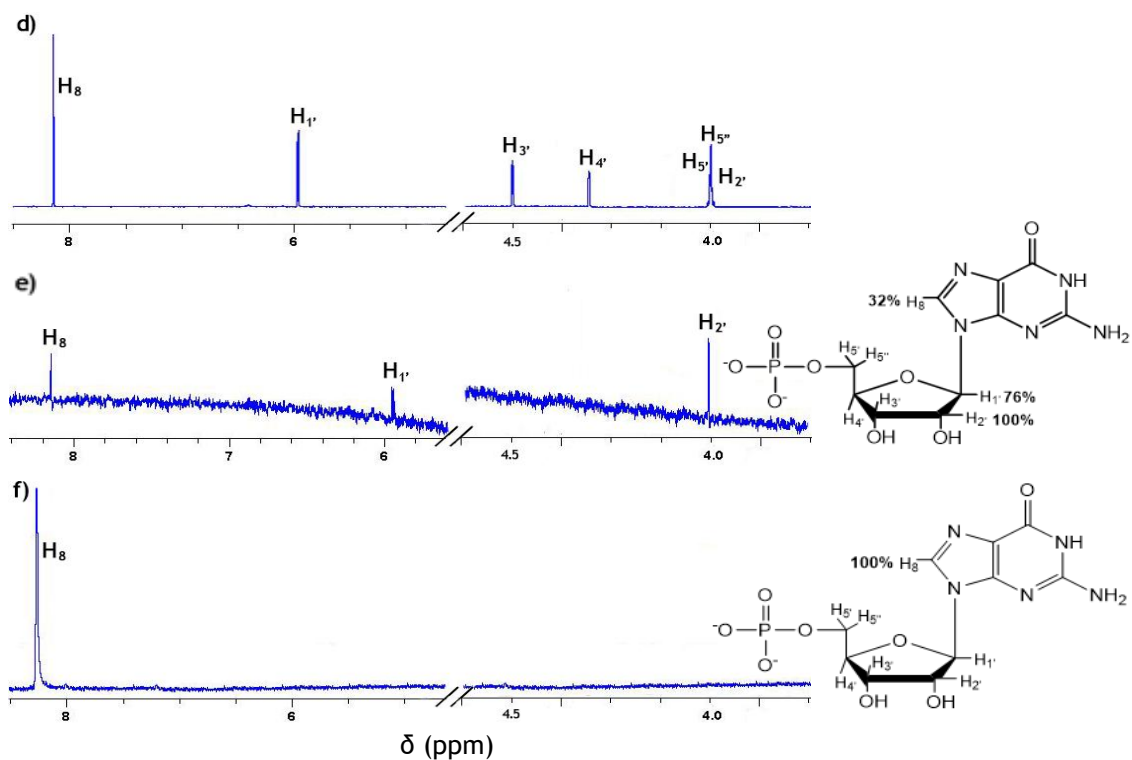


Figura 4.4.2 - Espectros de RMN-STD. (d) Espectro de referência de ^1H RMN de 5'-GMP; (e) Espectro de ^1H RMN-STD de 5'-GMP: suporte DAPP e (f) Espectro de ^1H RMN-STD de 5'-GMP:suporte ligando A.

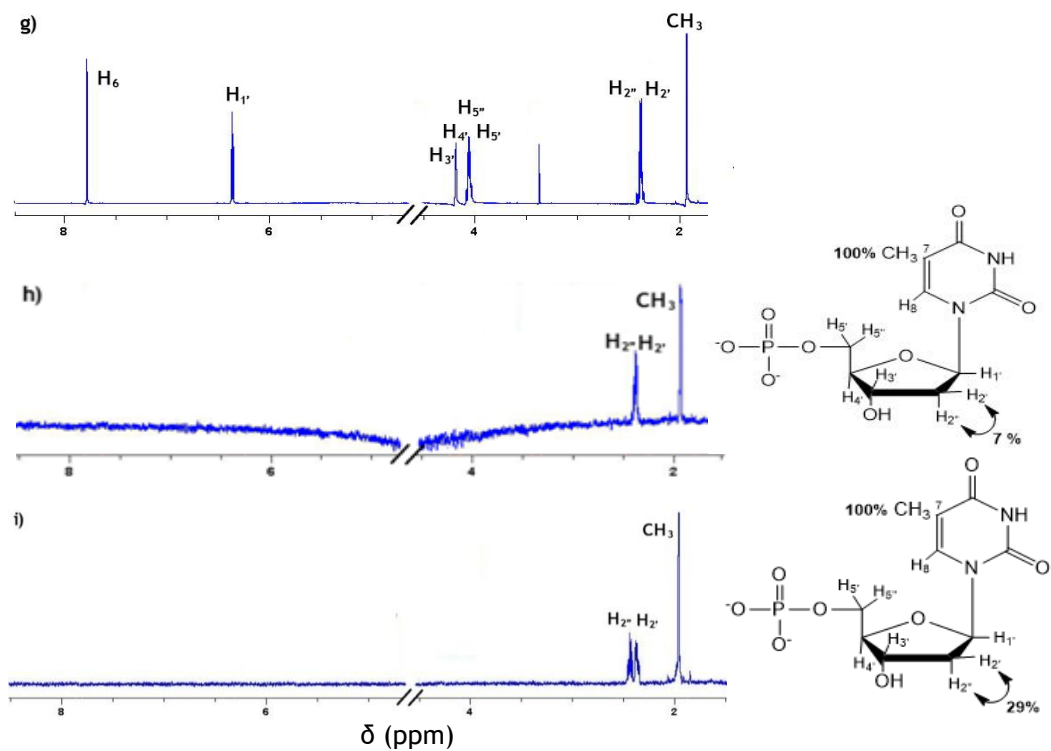


Figura 4.4.3 - Espectros de RMN-STD. (g) Espectro de referência de ^1H RMN do 5'-TMP; (h) Espectro de ^1H RMN-STD do 5'-TMP: suporte DAPP e (i) Espectro de ^1H RMN-STD de 5'-TMP: suporte ligando A.

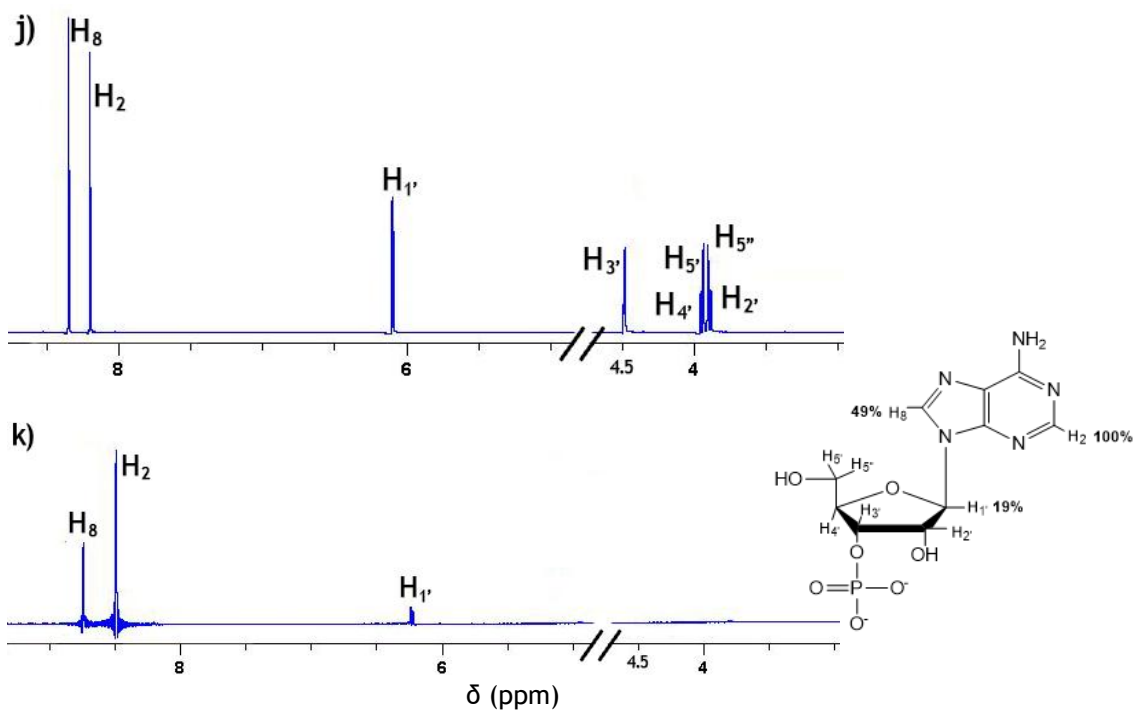


Figura 4.4.4 - Espectros de RMN-STD. (j) Espectro de referência de ^1H RMN de 3'-AMP e (k) Espectro de ^1H RMN-STD de 3'-AMP: suporte DAPP.

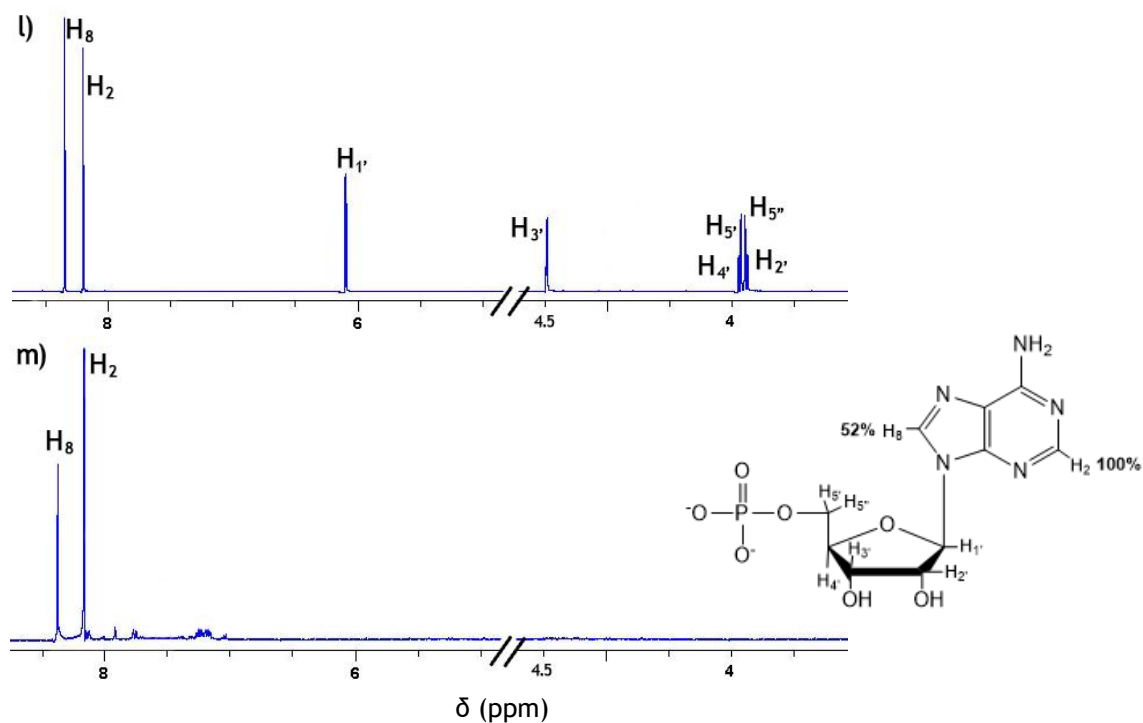


Figura 4.4.5 - Espectros de RMN-STD. (l) Espectro de referência de ^1H RMN de 5'-AMP e (m) Espectro de ^1H RMN-STD de 5'-AMP: suporte ligando A.

Na figura 4.4.6 apresenta-se as percentagens de STD de cada mononucleótido, relativas aos suportes DAPP-*Sepharose*[®] e ligando A-*Sepharose*[®] de forma a resumir os sinais de STD representados nos espectros de RMN e a sua % STD relativa, ou seja, % de saturação.

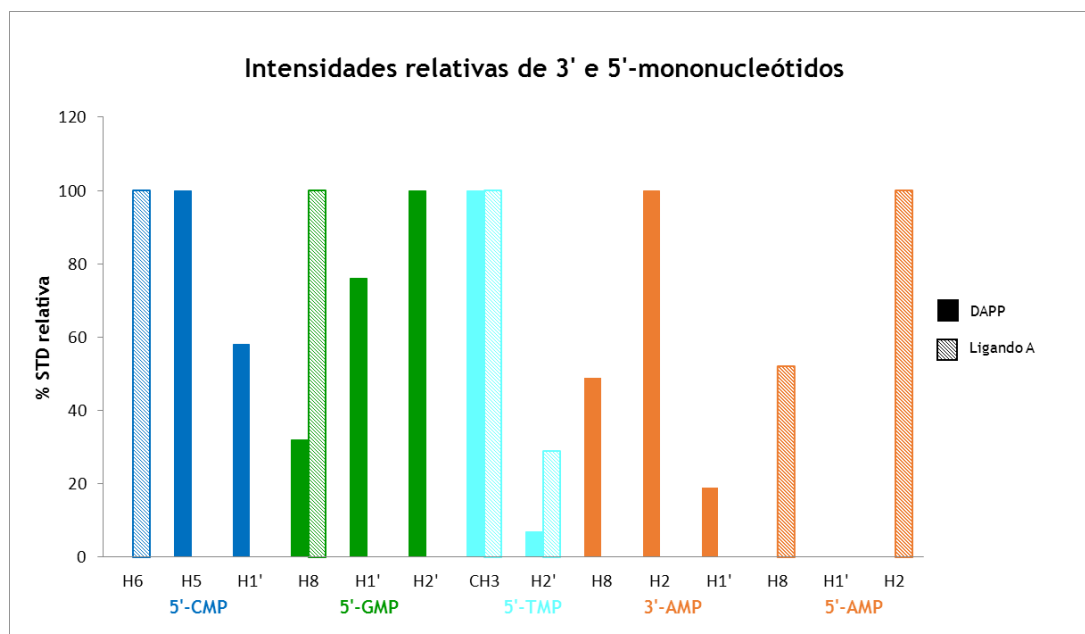


Figura 4.4.6 - Intensidades relativas dos mononucleótidos com os suportes DAPP-*Sepharose*[®]- (cor uniforme) e ligando A-*Sepharose*[®] (cor desvanecida).

De acordo com a análise da figura 4.4.1, relativa aos espectros do suporte DAPP-*Sepharose*[®] e o mononucleótido 5'-CMP, verifica-se a existência de sinais no espectro STD dos prótons H₅ e H_{1'} correspondentes à base e à desoxirribose, respetivamente. O próton H₅ tem a maior percentagem de saturação (100% de saturação), indicando a proximidade da base ao suporte. Da mesma maneira a interação do 5'-CMP com o suporte ligando A-*Sepharose*[®] é pelo próton H₆ da base (100% de saturação), não sendo detetados outros sinais de STD relativos a este suporte. As possíveis interações que ocorrem quando da ligação entre os suportes e as bases azotadas deverão ser catião- π e empilhamento π - π para o suporte DAPP-*Sepharose*[®] e empilhamento π - π no caso do ligando A-*Sepharose*[®]. Porém, a interação envolvida no suporte DAPP com a desoxirribose do mononucleótido é na sua maioria constituída por interações *van der Waals*.

Analisando os espectros de STD do 5'-GMP na presença do suporte DAPP-*Sepharose*[®] verifica-se que a interação é preferencial pela desoxirribose através dos prótons H_{2'} (100% de saturação) e H_{1'} (76% de saturação) prevalecendo as interações hidrofóbicas e de *van der Waals*. Foi ainda detetado um sinal de STD com o próton H₈ da guanina (32% de saturação) prevalecendo as interações por empilhamento π - π . De modo similar ao 5'-CMP e na presença do suporte ligando A-*Sepharose*[®] apenas foi detetado um sinal de STD envolvendo o próton H₈

da guanina (100% de saturação). Da mesma maneira, as interações envolvidas com o 5'-GMP e o suporte ligando A-*Sepharose*® são similares às observadas no 5'-CMP.

Contudo, através da análise dos espectros de STD do 5'-TMP com os suportes DAPP-*Sepharose*® e ligando A-*Sepharose*® verifica-se que os sinais de STD são idênticos e que o 5'-TMP interage preferencialmente pelo grupo metilo da base (100% de saturação). De forma similar, existe um sinal de STD de baixa intensidade relativo aos prótons H_{2'} e H_{2''} da desoxirribose (7% e 29% de saturação) para suporte DAPP-*Sepharose*® e ligando A-*Sepharose*®, respectivamente. Deste modo a interação do 5'-TMP em ambos os suportes é hidrofóbica, devido ao envolvimento do grupo metilo da base à desoxirribose.

Este estudo permitiu ainda identificar as diferenças na interação das posições 3'- e 5'-AMP do grupo fosfato com os suportes DAPP-*Sepharose*® e ligando A-*Sepharose*®. Verificou-se que a interação do 3'-AMP com o suporte DAPP-*Sepharose*® acontece preferencialmente pelos prótons H₂ e H₈ (100% e 49%, respectivamente) da base seguido de um sinal de STD menos intenso relativo ao próton H_{1'} (19% saturação) da desoxirribose. No entanto com o 5'-AMP a interação com o suporte ligando A-*Sepharose*® é apenas com os prótons H₂ e H₈ (100% e 52%, respectivamente) da base. Este resultado mostra que as interações π-π entre os anéis aromáticos do DAPP e do ligando A prevalecem com ambos os suportes.

4.2 - Estudo da afinidade entre as isoformas do pDNA e os ligandos utilizando a técnica de RPS

As isoformas do pVAX1-*LacZ* necessárias aos ensaios de afinidade foram verificadas quanto à sua topologia em eletroforese em gel de agarose 1 %. Devido à sua natureza polianiónica, as moléculas de DNA migram em direção ao ânodo (carregado positivamente). Por outro lado, e uma vez que o gel de agarose é poroso, as moléculas mais compactas irão migrar mais rapidamente. Assim, a isoforma sc, sendo a mais compacta migra mais, seguida da isoforma ln, enquanto a conformação oc surge mais próxima do pólo negativo (cátodo). Na figura 4.5 apresenta-se as diferentes isoformas do pVAX1-*LacZ* através de eletroforese em gel de agarose.

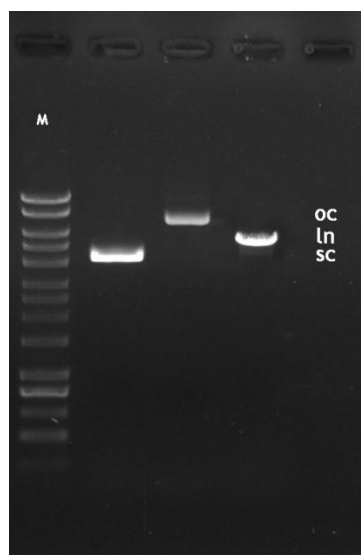


Figura 4.5. - Eletroforese em gel de agarose 1 % com o marcador de peso molecular (M) e as três isoformas (oc, ln e sc) de pVAX1-*LacZ* com 6,05 kpb.

Os ensaios de afinidade pDNA-ligando foram realizados no Biacore T200 (tecnologia baseada no fenómeno de RPS), com um sensor chip CM5. Os ligandos DAPP, ligando A e ligando D foram imobilizados numa matriz de dextrano carboximetilado ligada covalentemente à superfície de ouro, através da interação dos grupos amina. Os valores de imobilização dos ligandos DAPP, ligando A e ligando D foram 392,9 RU, 1012,5 RU e 364,9 RU por célula, respetivamente.

O valor da imobilização do ligando A é superior ao previsto potenciando problemas de transporte de massa, como a ligação de moléculas de analito ao ligando antes de chegarem à superfície do sensor. Por conseguinte, muitos dos resultados obtidos na célula do ligando A não são reprodutíveis, sendo necessário uma regeneração da superfície.

Posteriormente diferentes soluções das isoformas sc e ln do plasmídeo pVAX1-LacZ em Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) e acetato de sódio-CH₃COOH (10 mM, pH 5,0) foram injetadas a temperaturas diferentes (10 °C e a 25 °C). Foi utilizada solução de glicina-HCl pH 2,5 na célula do ligando A, uma vez que as isoformas de pDNA não foram removidas da superfície apenas com o tampão de corrida.

Os valores de K_D apresentados na tabela 3 foram obtidos através da aplicação do modelo de Langmuir e traçado da curva dos valores RU selecionados entre 300-400 s. A equação do modelo que permite calcular o K_D é: $R_{eq} = R_{máx} \cdot (1 / (1 + K_D / [A]))$, em que R_{eq} representa a quantidade de pDNA complexado com o ligando, $R_{máx}$ representa a capacidade máxima de ligação do pDNA, e $[A]$ é a concentração do pDNA (Gaspar et al., 2013). O valor K_D é inversamente proporcional à afinidade, ou seja, quanto maior o valor, menor a afinidade da isoforma do plasmídeo para o ligando, e vice-versa. O cálculo dos parâmetros foi realizado com o *software* BIAevaluation versão 4.1. Os sensogramas obtidos para pDNA-ligando revelaram um perfil de afinidade, exceto para pDNA-ligando A que apresenta um perfil cinético. Este resultado pode ser devido à elevada imobilização do ligando A no sensor chip.

Tabela 3 - Valores de K_D obtidos para as isoformas sc e ln e os ligandos DAPP, A e D às temperaturas de 10 °C e 25 °C nos tampões Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e acetato de sódio-CH₃COOH 10 mM pH 5,0.

		K_D (M)			
		Tris-HCl 10 mM		Acetato de sódio-CH ₃ COOH 10 mM	
Isof.	Lig.	T=10 °C	T=25 °C	T=10 °C	T=25 °C
sc	DAPP			$1,73 \times 10^{-7} \pm 5,7 \times 10^{-8}$	
	A		$8,65 \times 10^{-8} \pm 1,0 \times 10^{-8}$		
	D	$4,43 \times 10^{-7} \pm 9,8 \times 10^{-8}$	$2,97 \times 10^{-7} \pm 2,5 \times 10^{-8}$		
ln	DAPP				$5,77 \times 10^{-9} \pm 3,1 \times 10^{-9}$
	A				
	D	$3,89 \times 10^{-8} \pm 7,5 \times 10^{-9}$	$3,53 \times 10^{-8} \pm 7,9 \times 10^{-9}$		$1,84 \times 10^{-8} \pm 1,2 \times 10^{-9}$

Analisando a tabela 3, a isoforma ln apresenta os maiores valores de afinidade com os ligandos a ambas as temperaturas. O DAPP apresenta o maior valor de afinidade ($K_D = 5,77 \times 10^{-9} \pm 3,1 \times 10^{-9}$ M mostrado no gráfico 4.6) com a isoforma ln a 25 °C (Figura 4.6) e o menor valor com a isoforma sc ($K_D = 1,73 \times 10^{-7} \pm 5,7 \times 10^{-8}$ M). O DAPP apenas apresentou sinal de RPS em tampão acetato de sódio. Este resultado pode ser comparado com a AC utilizando o suporte DAPP-Sepharose® no qual o pDNA sc é retido em tampão de acetato a pH 5,0 (Caramelo-Nunes et al., 2013b). Além disso, o DAPP também foi testado com um tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8 em AC, sem sulfato de amônio ou cloreto de sódio, sendo o pDNA completamente

eluído imediatamente após a injeção da amostra (Caramelo-Nunes et al., 2013a). Este resultado é similar ao observado em RPS, pois nestas condições não se observou sinal de RPS entre o DAPP e as isoformas de pDNA.

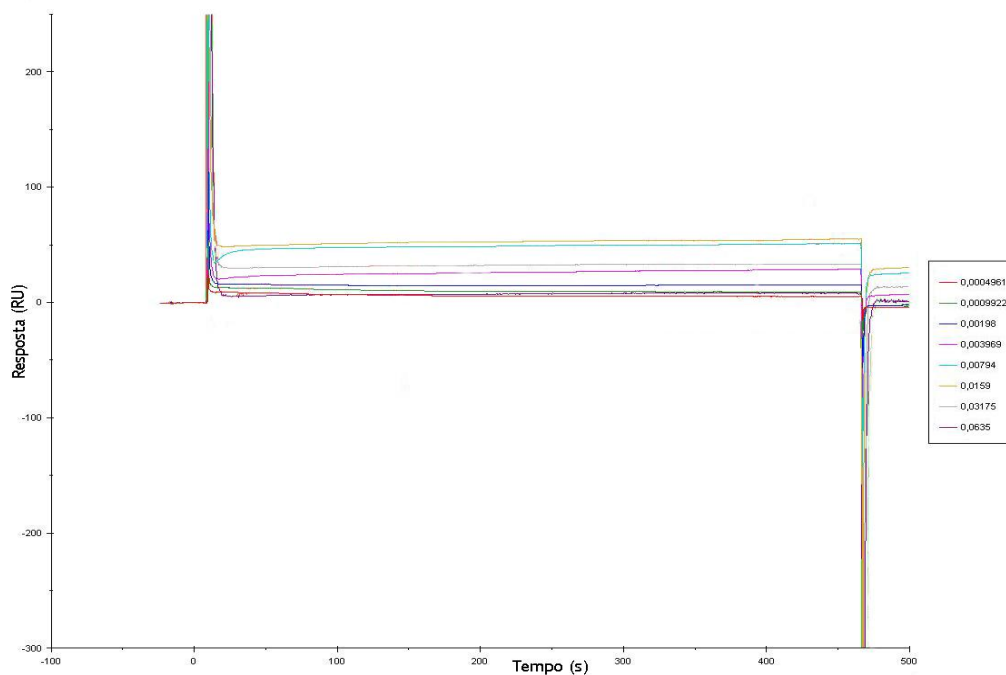


Figura 4.6 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando DAPP: isoforma ln em acetato de sódio-CH₃COOH a 25 °C.

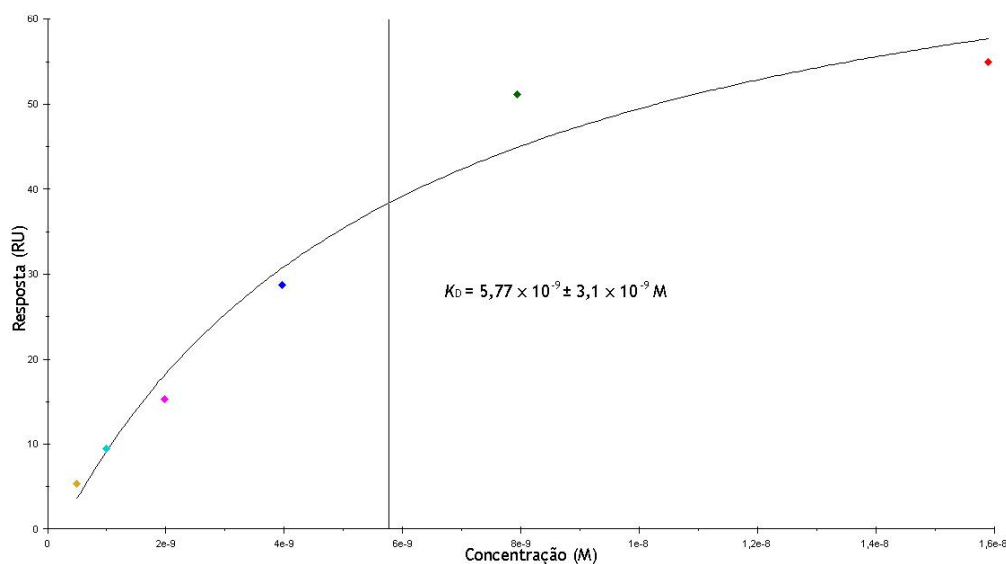


Gráfico 4.6 - Resposta (RU) vs Concentração (M) da formação do complexo ligando DAPP: isoforma ln em acetato de sódio-CH₃COOH a 25 °C.

Os valores de K_D obtidos para o ligando D encontram-se dentro da mesma ordem de grandeza indicando que as interações estabelecidas com as isoformas sc e ln do plasmídeo pVAX1-LacZ em Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) e acetato de sódio-CH₃COOH (10 mM pH 5,0) são muito

semelhantes. Verificou-se que a solução Tris-HCl promove interações com o ligando D, observando-se através da figura 4.7 maior afinidade com a isoforma sc à temperatura de 25 °C ($K_D = 2,97 \times 10^{-7} \pm 2,5 \times 10^{-8}$ M) do que a 10 °C observado na figura 4.8 ($K_D = 4,43 \times 10^{-7} \pm 9,8 \times 10^{-8}$ M).

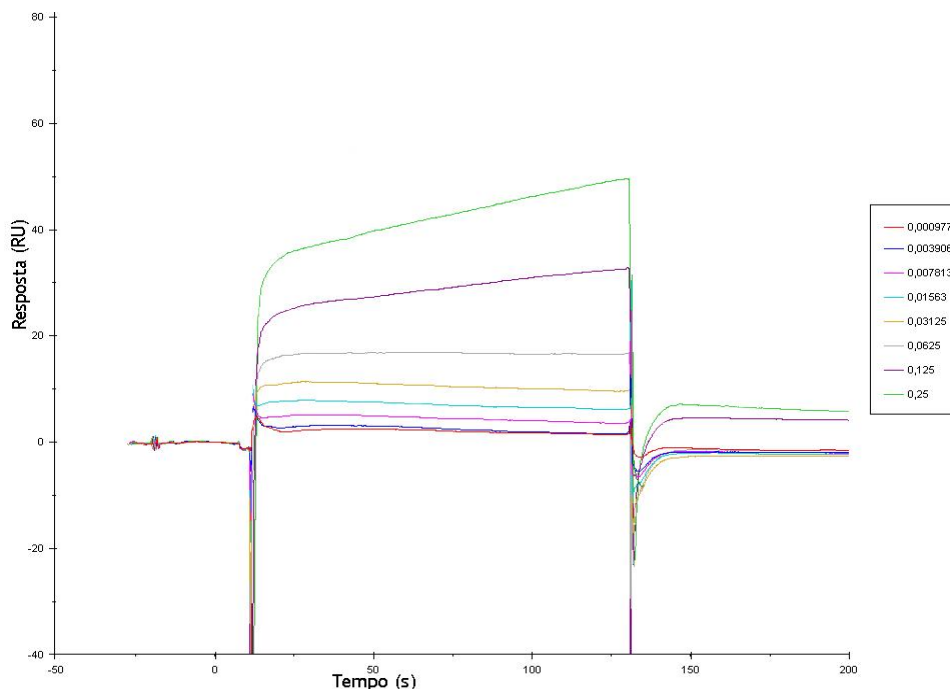


Figura 4.7 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando D: isoforma sc em Tris-HCl a 25 °C.

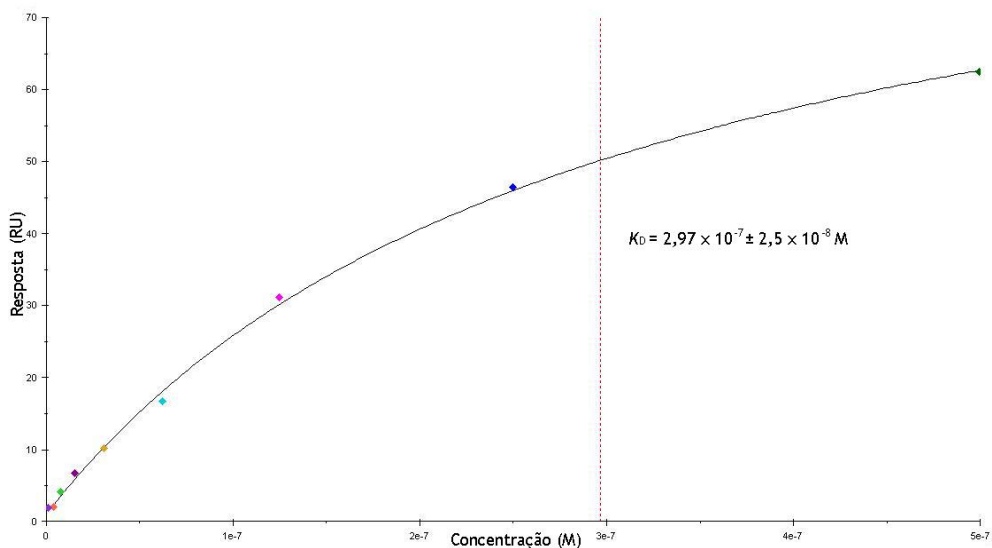


Gráfico 4.7 - Resposta (RU) vs Concentração (M) da formação do complexo ligando D: isoforma sc em Tris-HCl a 25 °C.

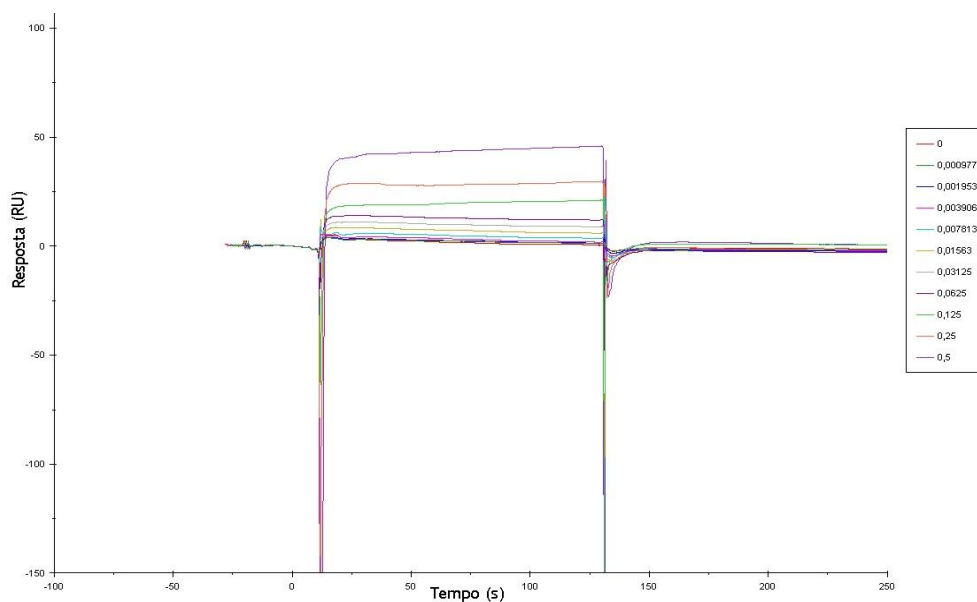


Figura 4.8 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando D: isoforma sc em Tris-HCl a 10 °C.

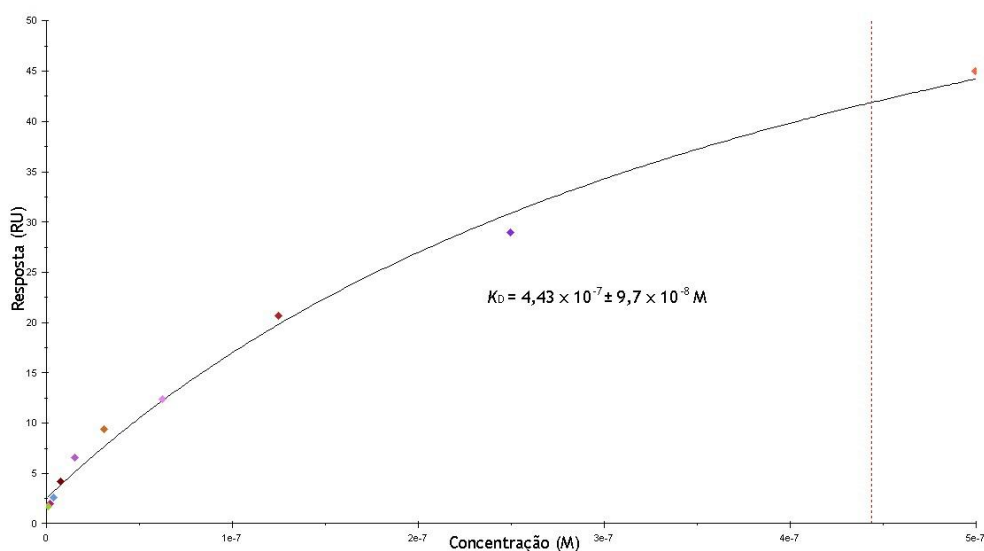


Gráfico 4.8 - Resposta (RU) vs Concentração (M) da formação do complexo ligando D: isoforma sc em Tris-HCl a 10 °C.

No entanto, o ligando D tem maior afinidade para a isoforma ln do que para a sc em Tris-HCl, apesar da ordem de grandeza de K_D ser idêntica. Também os valores de K_D são idênticos a ambas temperaturas ($K_D = 3,89 \times 10^{-8} \pm 7,5 \times 10^{-9}$ M a 10 °C e $K_D = 3,53 \times 10^{-8} \pm 7,9 \times 10^{-9}$ M a 25 °C) indicando que a temperatura não influencia a força da interação.

Comparativamente, este ligando tem maior afinidade para a isoforma ln, do que para a sc, em tampão Tris-HCl em ambas as temperaturas.

Contrariamente, aos resultados obtidos para o DAPP e ligando D, torna-se difícil comparar K_D em relação ao ligando A, uma vez que este apresenta uma elevada resposta na imobilização no sensor chip e conseqüentemente comprometeu o cálculo da K_D (mostrado na figura 4.10).

O ligando A, apenas foi possível obter o valor de K_D (Gráfico 4.9) em Tris-HCl 10 mM, para a isoforma sc a 25 °C (Figura 4.9).

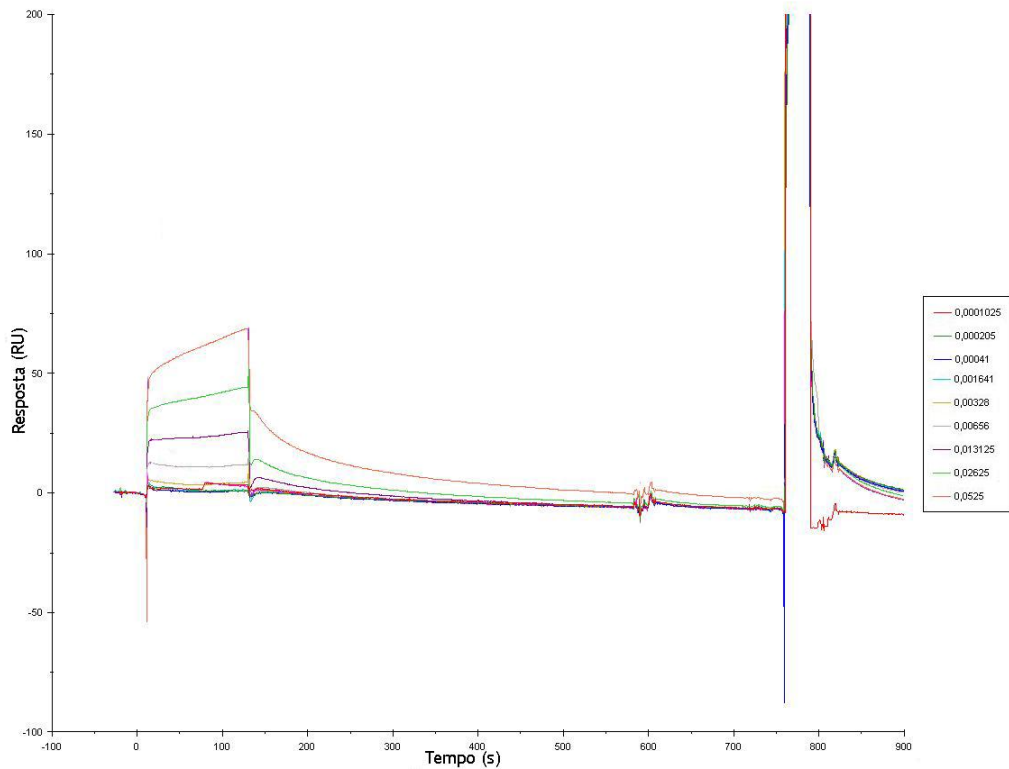


Figura 4.9 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando A: isoforma sc em Tris-HCl a 25 °C.

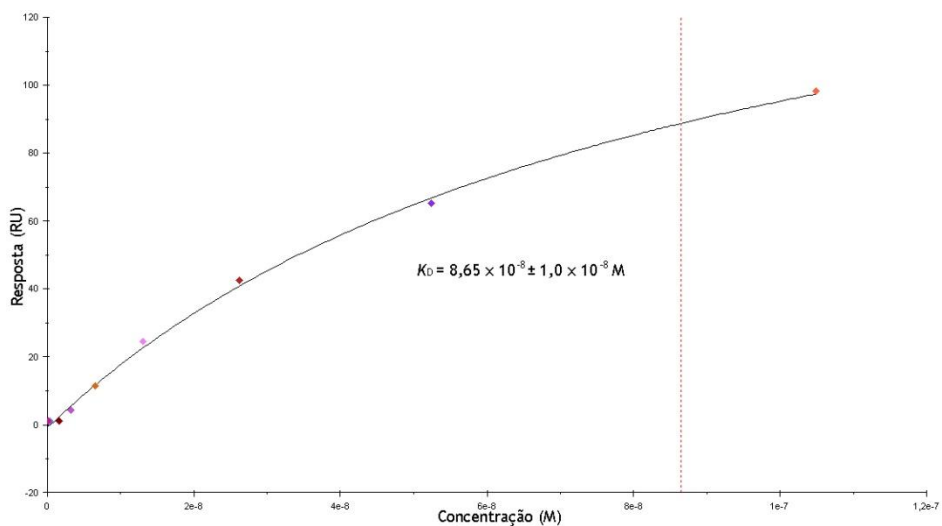


Gráfico 4.9 - Resposta (RU) vs Concentração (M) da formação do complexo ligando A: isoforma sc em Tris-HCl a 25 °C.

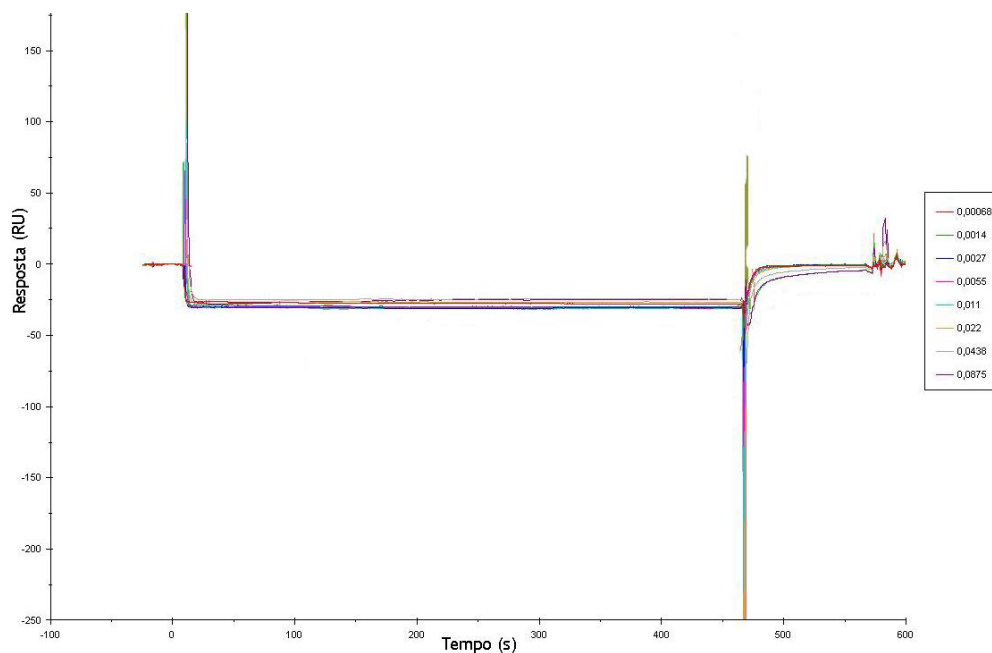


Figura 4.10 - Perfil do sensograma da formação do complexo ligando A: isoforma ln em Tris-HCl a 10 °C.

Em suma, o ligando A tem maior afinidade para a isoforma sc a 25 °C, sendo este um ligando promissor para a purificação de pDNA sc, enquanto que, o ligando D tem menor afinidade para esta isoforma em Tris-HCl a 10 °C. Porém, o ligando que tem maior afinidade para a isoforma ln é o DAPP em acetato de sódio-CH₃COOH 10 mM a 25 °C, seguido do ligando D em Tris-HCl 10 mM a 10 °C. O resultado relativamente ao DAPP, Assim, quando utilizado o tampão acetato de sódio-CH₃COOH 10 mM a pH 5 como em AC, o DAPP tem afinidade para as isoformas do pDNA. Do mesmo modo, em AC houve retenção do pDNA em acetato de sódio-CH₃COOH promovendo-se a eluição das isoformas oc e ln quando aumentava a concentração de cloreto de sódio para 0,22 M. A eluição da isoforma sc verificou-se quando se aumentou a concentração de cloreto de sódio para 0,55 M (Caramelo-Nunes et al., 2013a). Os resultados do DAPP em tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8 em AC são similares aos observados em RPS, na medida em que não foi detetado sinal (Caramelo-Nunes et al., 2013b).

Comparando os resultados obtidos em AC e RPS para o DAPP são similares no ponto de vista de associação das isoformas de pDNA para o ligando. Porém, não se podem comparar as duas técnicas, uma vez que as condições químicas e físicas de ambas são muito diferentes.

Capítulo 5 - Conclusões

A utilização de novos ligandos em AC tem sido explorada na purificação de DNA plasmídico, nomeadamente para isolar a isoforma sc. As vantagens são melhorar o rendimento do processo de purificação e obter a isoforma sc com maior grau de pureza para aplicações terapêuticas.

Neste trabalho, foram sintetizados quatro ligandos aromáticos semelhantes ao ligando comercial, DAPP, com o objetivo de desenvolver novos suportes de afinidade para purificação do pDNA. As técnicas de RMN-STD, HR-MAS RMN e RPS permitiram caracterizar e identificar as interações intermoleculares e quantificar a afinidade entre os ligandos e as isoformas sc e ln do pVAX-LacZ e mononucleótidos. Os ligandos B e C são pouco solúveis em solução aquosa e como tal não foi possível estudar a afinidade por RPS e consequentemente imobilizar na *Sepharose*®. A imobilização do ligando A na matriz epóxido foi confirmada pelo desvio químico dos prótons a 7,5 ppm e 4,1 ppm da *Sepharose*®. Através da RMN-STD verificou-se que as interações entre os suportes DAPP-*Sepharose*® e ligando A-*Sepharose*® com o 5'-CMP são preferencialmente pelas bases, sugerindo interações de empilhamento π - π entre os anéis aromáticos dos ligandos e os mononucleótidos. Quando se estudou o efeito da substituição do grupo fosfato nas posições 3' e 5' do AMP com os suportes, não houve diferença no tipo de interações observadas (empilhamento π - π), uma vez que os grupos envolvidos na interação são os prótons H₈ e H₂ da base. As interações predominantes com o 5'-TMP são hidrofóbicas, devido ao envolvimento do grupo metilo com ambos os suportes. Verificou-se que o 5'-GMP interage com o suporte DAPP pela desoxirribose podendo estar envolvidas interações fracas de distâncias curtas (interações *van der Waals*) e interações hidrofóbicas, ao contrário do suporte do ligando A que são preferencialmente pela base prevalecendo as interações por empilhamento π - π .

Os resultados apresentados por RPS indicaram que o DAPP apresentou maior afinidade para a isoforma ln a 25 °C ($K_D=5,77 \times 10^{-9} \pm 3,1 \times 10^{-9}$ M) em acetato de sódio-CH₃COOH. Contrariamente, o ligando D apresentou valores de K_D dentro da mesma ordem de grandeza em Tris-HCl para as isoformas sc e ln a ambas as temperaturas, verificando-se maior afinidade para a isoforma ln ($K_D= 3,89 \times 10^{-8} \pm 7,5 \times 10^{-9}$ M) a 10 °C. O ligando A apresentou maior afinidade em Tris-HCl para a isoforma sc a 25 °C ($K_D= 8,65 \times 10^{-8} \pm 1,0 \times 10^{-8}$ M) comparativamente com os restantes ligandos. Em suma, os resultados obtidos mostraram que o ligando A é promissor para purificar pDNA por cromatografia de afinidade.

Capítulo 6 - Perspetivas futuras

Este trabalho demonstrou que o ligando mais promissor para ser utilizado em AC é o ligando A. Deste modo o suporte ligando *A-Sepharose*® irá ser sintetizado em maior escala para ser testado na separação das isoformas do pVAX-*LacZ* utilizando o sistema de cromatografia líquida ÄKTA™. Diferentes condições experimentais tais como temperatura, força iónica, pH serão avaliadas na eficácia da separação da isoforma sc. A pureza da isoforma sc pDNA será avaliada por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC). O estudo do mecanismo de intercalação do ligando sintetizado quando este se liga ao DNA poderá ser avaliado por medições de fluorescência (como por exemplo num espectralfluorímetro FluoroMax-4 Horiba), cristalografia de raios-X e métodos hidrodinâmicos, tais como a viscosidade, medições de dicroísmo e espectroscopia de RMN.

Referências

Bakhtiar R (2013) Surface Plasmon Resonance Spectroscopy: A versatile Technique in a Biochemist's Toolbox. *Journal of Chemical Education* 90:203-209.

Barbosa HS, Hine AV, Brocchini S, et al (2010) Dual affinity method for plasmid DNA purification in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography A* 1217:1429-1436.

Bonturi N, Radke VS, Bueno SM, et al (2013) Sodium citrate and potassium phosphate as alternative adsorption buffers in hydrophobic and aromatic thiophilic chromatographic purification of plasmid DNA from neutralized lysate. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 919-920:67-74.

Caramelo-Nunes C, Almeida P, Marcos JC, et al (2013a) Specific recognition of supercoiled plasmid DNA by affinity chromatography using the intercalator DAPP as ligand. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 928:121-124.

Caramelo-Nunes C, Almeida P, Marcos JC, et al (2014) Aromatic ligands for plasmid deoxyribonucleic acid chromatographic analysis and purification: an overview. *Journal of Chromatography A* 1327:1-13.

Caramelo-Nunes C, Bicho D, Almeida P, et al (2013b) Dynamic binding capacity and specificity of 3,8-diamino-6-phenylphenanthridine-Sepharose support for purification of supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of chromatography A* 1307:91-98.

Caramelo-Nunes C, Gabriel MF, Almeida P, et al (2012) Purification of plasmid DNA from clarified and non-clarified *Escherichia coli* lysates by berenil pseudo-affinity chromatography. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 904:81-87.

Caramelo-Nunes C, Tente T, Almeida P, et al (2011) Specific berenil-DNA interactions: an approach for separation of plasmid isoforms by pseudo-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* 412:153-158.

Carbonell E, Delgado-Pinar E, Pitarch-Jarque J, et al (2013) Boehmite Supported Pyrene Polyamine Systems as Probes for Iodide Recognition. *The Journal of Physical Chemistry C* 117:14325-14331.

Carvalho LR, Corvo MC, Enugala R, et al (2010) Application of HR-MAS NMR in the solid-phase synthesis of a glycopeptide using Sieber amide resin. *Magnetic Resonance in Chemistry* 48:323-330.

Cho BT, Kang SK (2005) Direct and indirect reductive amination of aldehydes and ketones with solid acid-activated sodium borohydride under solvent-free conditions. *Tetrahedron* 61:5725-5734.

Cimecioglu AL, Weiss RA (1995) Aromatic polyamides of 3,8-diamino-6-phenylphenanthridine and their molecular complexes with sulfonated polystyrene ionomers. *Macromolecules* 28:6343-6346.

Clares MP, Aguilar J, Aucejo R, et al (2004) Synthesis and H⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ coordination behavior of a bis(fluorophoric) bibrachial lariat aza-crown. *Inorganic Chemistry* 43:6114-6122.

Colman A, Byers MJ, Primrose SB, et al (1978) Rapid purification of plasmid DNAs by hydroxyapatite chromatography. *European Journal of Biochemistry* 91:303-310.

Cruz C, Boto RE, Almeida P, et al (2011a) Study of specific interaction between nucleotides and dye support by nuclear magnetic resonance. *Journal of Molecular Recognition* 24:975-980.

Cruz C, Cabrita EJ, Queiroz JA (2011b) Analysis of nucleotides binding to chromatography supports provided by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A* 1218:3559-3564.

Cruz C, Cabrita EJ, Queiroz JA (2011c) Screening nucleotide binding to amino acid-coated supports by surface plasmon resonance and nuclear magnetic resonance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401:983-993.

Cruz C, Santos SD, Cabrita EJ, et al (2013) Binding analysis between L-histidine immobilized and oligonucleotides by SPR and NMR. *International Journal of Biological Macromolecules* 56:175-180.

Cruz C, Sousa A, Sousa F, et al (2012) Study of the specific interaction between L-methionine chromatography support and nucleotides. *Journal of chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 909:1-5.

Delattre C, Kamalanathan AS, Michaud P, et al (2008) Purification of oligouronides by immobilized L-histidine pseudoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 861:181-185.

Delattre C, Michaud P, Hamze K, et al (2005) Purification of oligouronides using hollow-fiber membrane functionalised with L-histidine. *Journal of Chromatography A* 1099:121-126.

Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DM (2005) Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A* 1069:3-22.

Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J (2007) Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *The Journal of Gene Medicine* 9:833-842.

Eon-Duval A, Burke G (2004) Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 804:327-335.

Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, et al (2011) Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clinical infectious diseases : Vaccines* 53:296-302.

Flotte TR (2007) Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *Journal of Cellular Physiology* 213:301-305.

Gaspar VM, Cruz C, Queiroz JA, et al (2013) Sensitive detection of peptide-minicircle DNA interactions by surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry* 85:2304-2311.

Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J (2013) Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *The Journal of Gene Medicine* 15:65-77.

Hai-yan Z, Jing L, Yong-heng X, et al (2010) Synthesis, Structure and Properties of Tren-Schiff Base Compound and Its Manganese(III) Complex by Original Self-assembly Reaction. *Chemical Research in Chinese Universities* 26(5):687–692.

Handbook Biacore sensor surface (2008) Edition AB. 7-78

Hannon MJ (2007) Supramolecular DNA recognition. *Chemical Society Reviews* 36:280-295.

Hua XF, Liu TC, Cao YC, et al (2006) Characterization of the coupling of quantum dots and immunoglobulin antibodies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386:1665-1671.

Jackson DA, Juranek S, Lipps HJ (2006) Designing nonviral vectors for efficient gene transfer and long-term gene expression. *Molecular therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 14:613-626.

Jahreis G, Peters K, Kirschke H (2001) Purification of soluble and membrane-bound proteases with substrate-analogous inhibitors by affinity chromatography. *Journal of biochemical and Biophysical Methods* 49:491-505.

Johnson TR, Ilan J (1983) Large-scale isolation of plasmid DNA and purification of lambda phage DNA using hydroxylapatite chromatography. *Analytical Biochemistry* 132:20-25.

Khan KH (2013) DNA vaccines: roles against diseases. *Germs* 3:26-35.

Kubar T, Hanus M, Ryjacek F, et al (2005) Binding of cationic and neutral phenanthridine intercalators to a DNA oligomer is controlled by dispersion energy: quantum chemical calculations and molecular mechanics simulations. *Chemistry* 12:280-290.

Mateen I, Irshad S (2011) A Review on DNA Vaccines. *Journal of Health Sciences* 1(1):1-7.

Misra VK, Honig B (1995) On the magnitude of the electrostatic contribution to ligand-DNA interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:4691-4695.

Montbriand PM, Malone RW (1996) Improved method for the removal of endotoxin from DNA. *Journal of Biotechnology* 44:43-46.

Murphy JC, Jewell DL, White KI, et al (2003) Nucleic acid separations utilizing immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnology Progress* 19:982-986.

Neto BA, Lapis AA (2009) Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends. *Molecules* 14:1725-1746.

Oliveira PH, Prather KJ, Prazeres DM, et al (2009) Structural instability of plasmid biopharmaceuticals: challenges and implications. *Trends in Biotechnology* 27:503-511.

Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ (2005) DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* 7:E61-77.

Pedras B, Oliveira E, Santos H, et al (2009) A new tripodal poly-imine indole-containing ligand: Synthesis, complexation, spectroscopic and theoretical studies. *Inorganica Chimica Acta* 362:2627-2635.

Prazeres DM, Ferreira GN, Monteiro GA, et al (1999) Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends in Biotechnology* 17:169-174.

Raiado-Pereira L, Carapeto AP, Rego AMB, et al (2012) Grafting hydrophobic and affinity interaction ligands on membrane adsorbers: A close-up “view” by X-ray photoelectron spectroscopy. *Separation and Purification Technology* 93:75-82.

Schluep T, Cooney CL (1998) Purification of plasmids by triplex affinity interaction. *Nucleic Acids Research* 26:4524-4528.

Schluep T, Cooney CL (1999) Immobilization of oligonucleotides on a large pore support for plasmid purification by triplex affinity interaction. *Bioseparation* 7:317-326.

Sousa A, Sousa F, Queiroz JA (2009a) Biorecognition of supercoiled plasmid DNA isoform in lysine-affinity chromatography. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877:3257-3260.

Sousa A, Sousa F, Queiroz JA (2010) Differential interactions of plasmid DNA, RNA and genomic DNA with amino acid-based affinity matrices. *Journal of Separation Science* 33:2610-2618.

Sousa F, Freitas S, Azzoni AR, et al (2006) Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 45:131-140.

Sousa F, Matos T, Prazeres DM, et al (2008a) Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* 374:432-434.

Sousa F, Prazeres DM, Queiroz JA (2008b) Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends in Biotechnology* 26:518-525.

Sousa F, Prazeres DM, Queiroz JA (2009b) Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *The Journal of Gene Medicine* 11:79-88.

Sousa F, Queiroz JA (2011) Supercoiled plasmid quality assessment by analytical arginine-affinity chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218:124-129.

Sousa F, Tomaz CT, Prazeres DM, et al (2005) Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support. *Analytical Biochemistry* 343:183-185.

Sundberg L, Porath J (1974) Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *Journal of Chromatography* 90:87-98.

Viegas A, Manso J, Nobrega FL, et al (2011) Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *Journal of Chemical Education* 88:990-994.

Wagstaff JL, Taylor SL, Howard MJ (2013) Recent developments and applications of saturation transfer difference nuclear magnetic resonance (STD NMR) spectroscopy. *Molecular BioSystems* 9:571-577.

Wils P, Escriou V, Warnery A, et al (1997) Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography. *Gene Therapy* 4:323-330.

Woodgate J, Palfrey D, Nagel DA, et al (2002) Protein-mediated isolation of plasmid DNA by a zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. *Biotechnology and Bioengineering* 79:450-456.

Zhang J, Lakowicz JR (2005) Enhanced luminescence of phenyl-phenanthridine dye on aggregated small silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* 109:8701-8706.

Anexos

Anexo I - Espetros de RMN complementares à caracterização do ligando A.

Anexo II - Espetros de RMN complementares à caracterização do ligando B.

Anexo III - Espetros de RMN complementares à caracterização do ligando C.

Anexo IV - Espetros de RMN complementares à caracterização do ligando D.

Anexo I

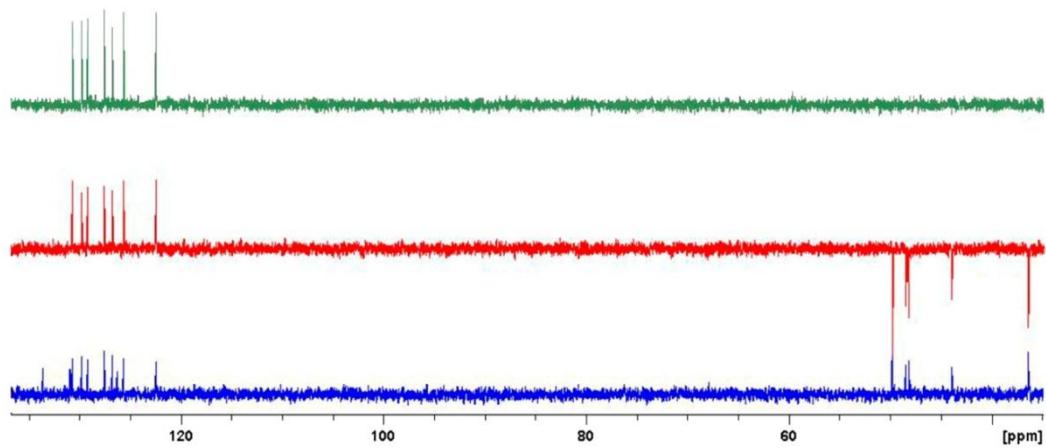


Figura A1 - Espectro de ^{13}C RMN (azul), DEPT135 (vermelho) e DEPT90 (verde) do ligando A.

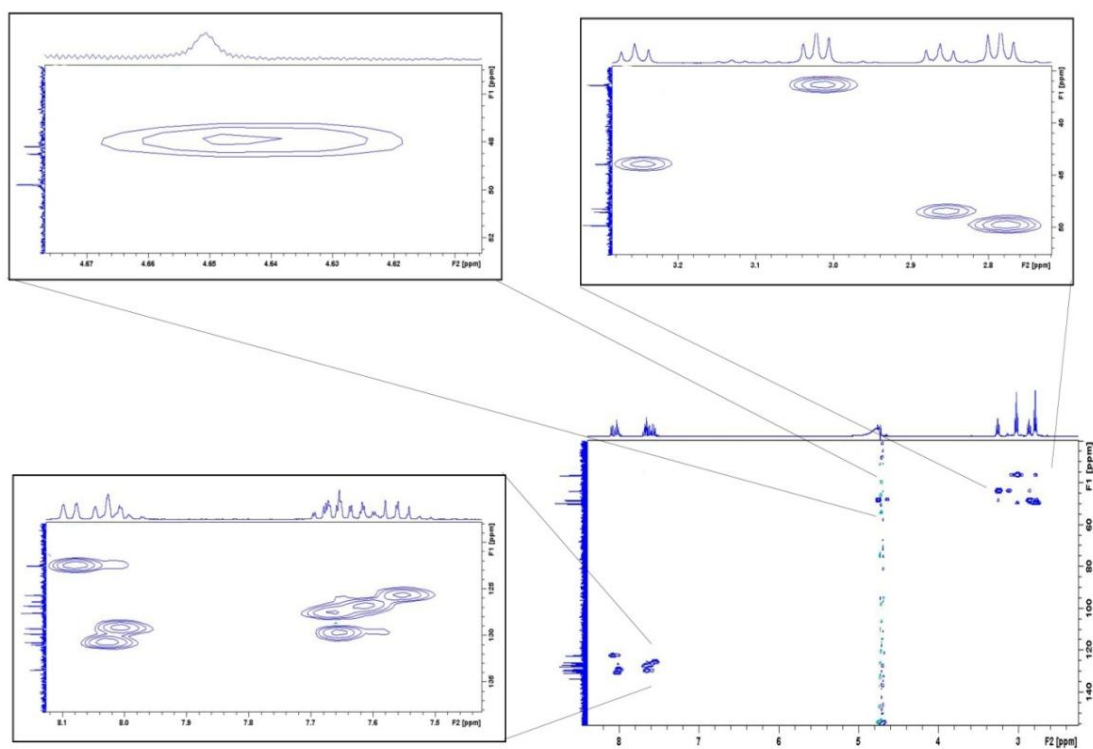


Figura A2 - Espectro de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC RMN do ligando A.

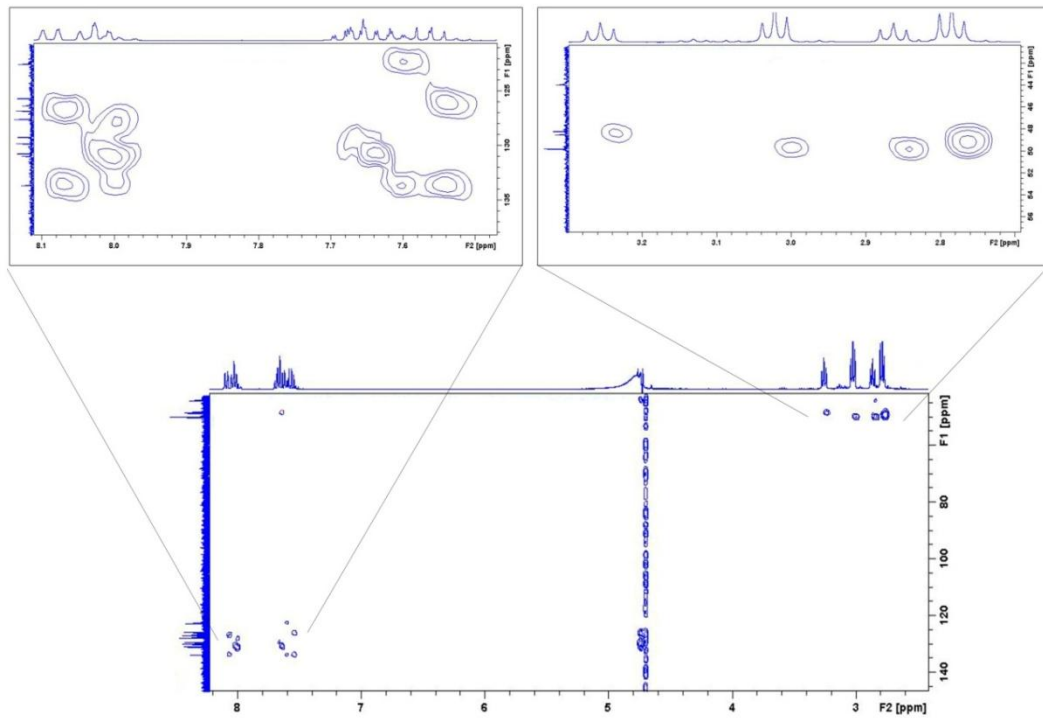


Figura A3 - Espectro de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC RMN do ligando A.

Anexo II

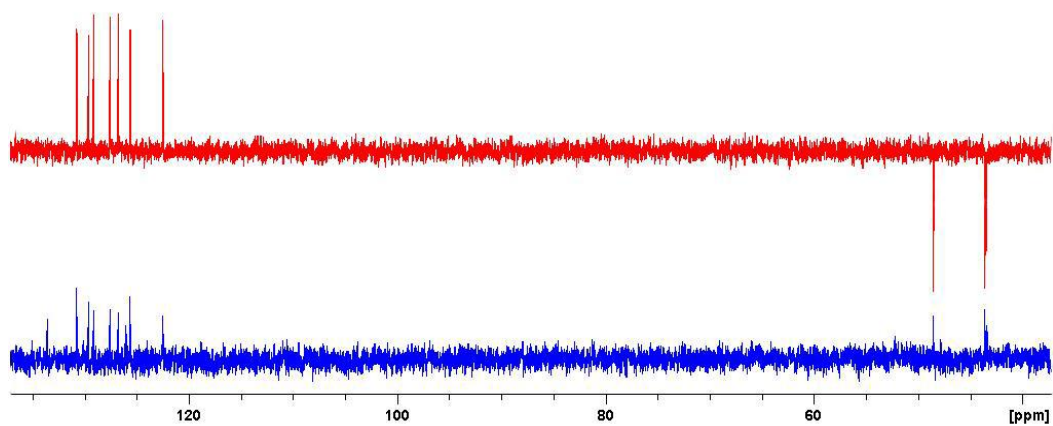


Figura B1 - Espectro de ^{13}C RMN (azul), DEPT135 (vermelho) do ligando B.

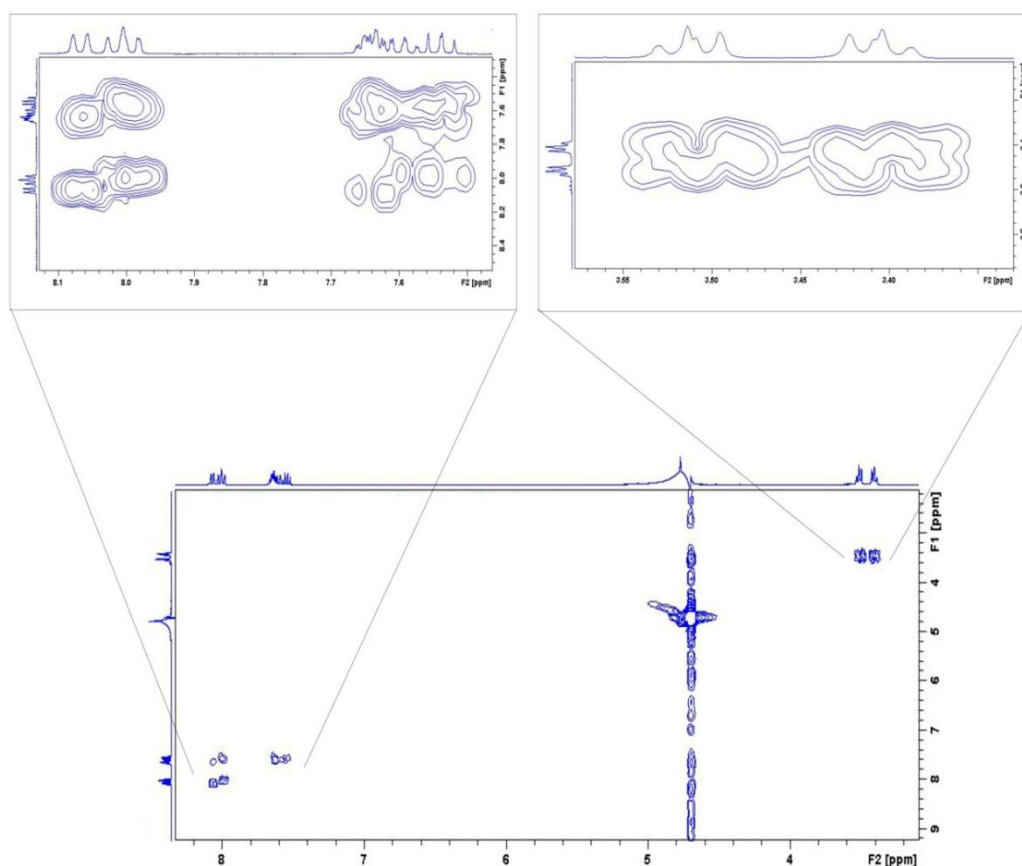


Figura B2 - Espectro de ^1H - ^1H COSY RMN do ligando B.

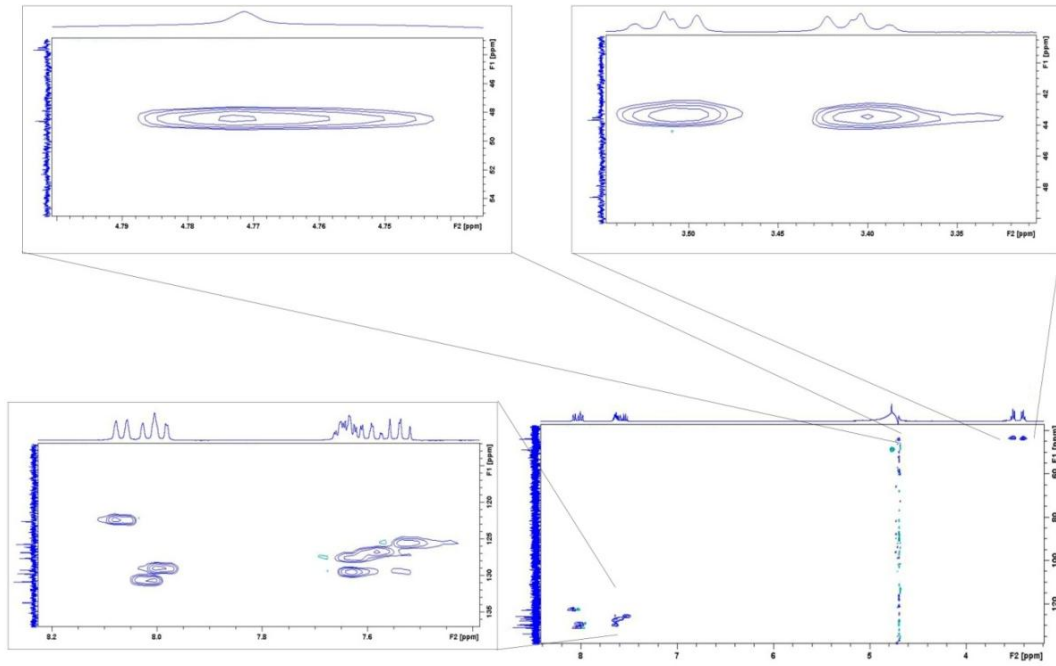


Figura B3 - Espectro de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC RMN do ligando B.

Anexo III

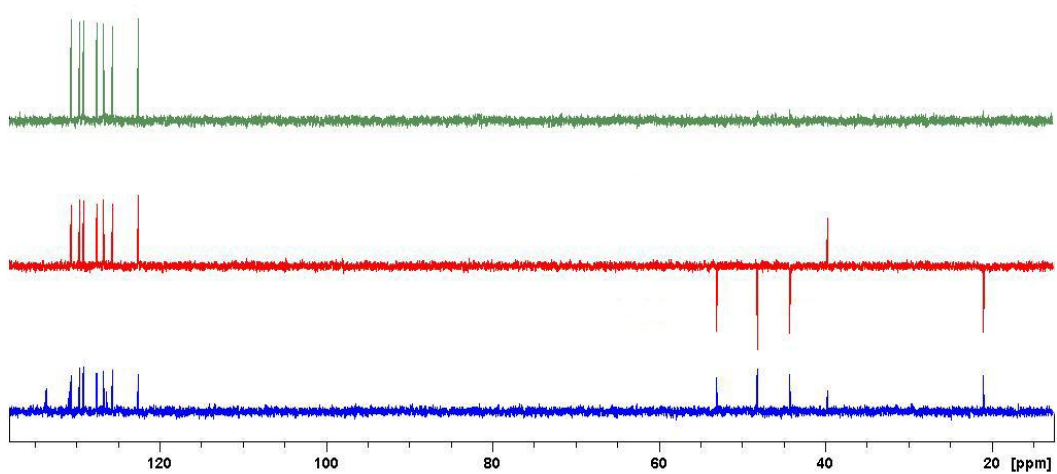


Figura C1 - Espectro de ^{13}C RMN (azul), DEPT135 (vermelho) e DEPT90 (verde) do ligando C.

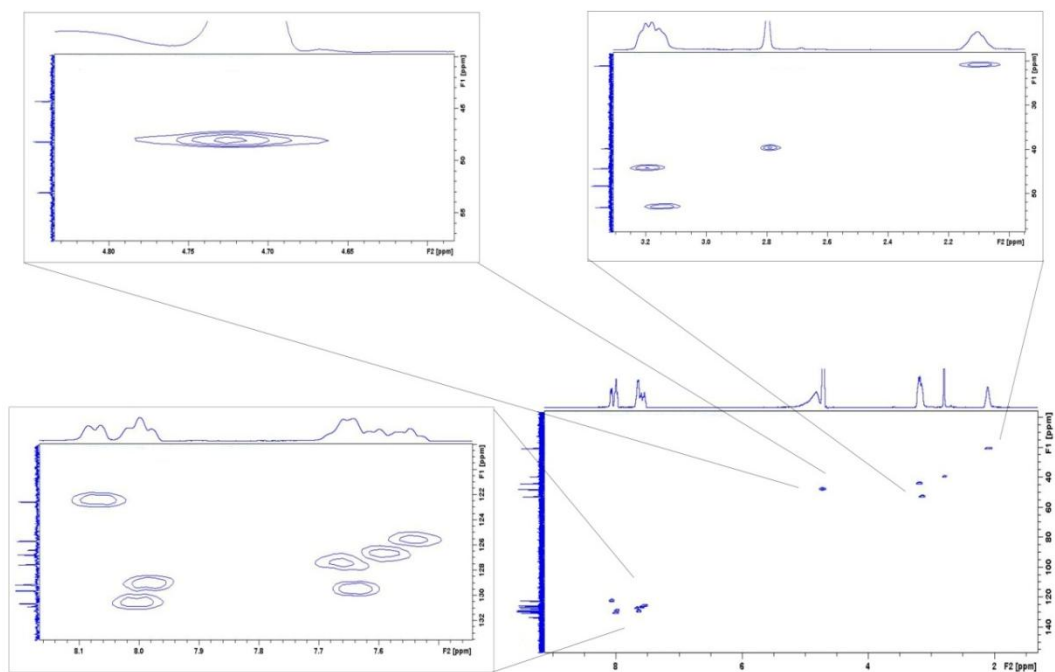


Figura C2 - Espectro de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC RMN do ligando C.

Anexo IV

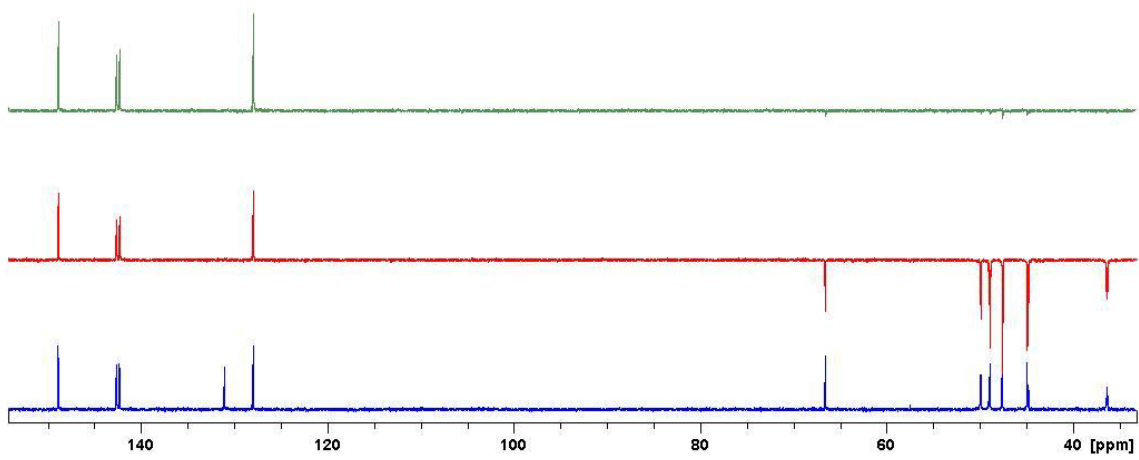


Figura D1 - Espectro de ^{13}C RMN (azul), DEPT135 (vermelho) e DEPT90 (verde) do ligando D.

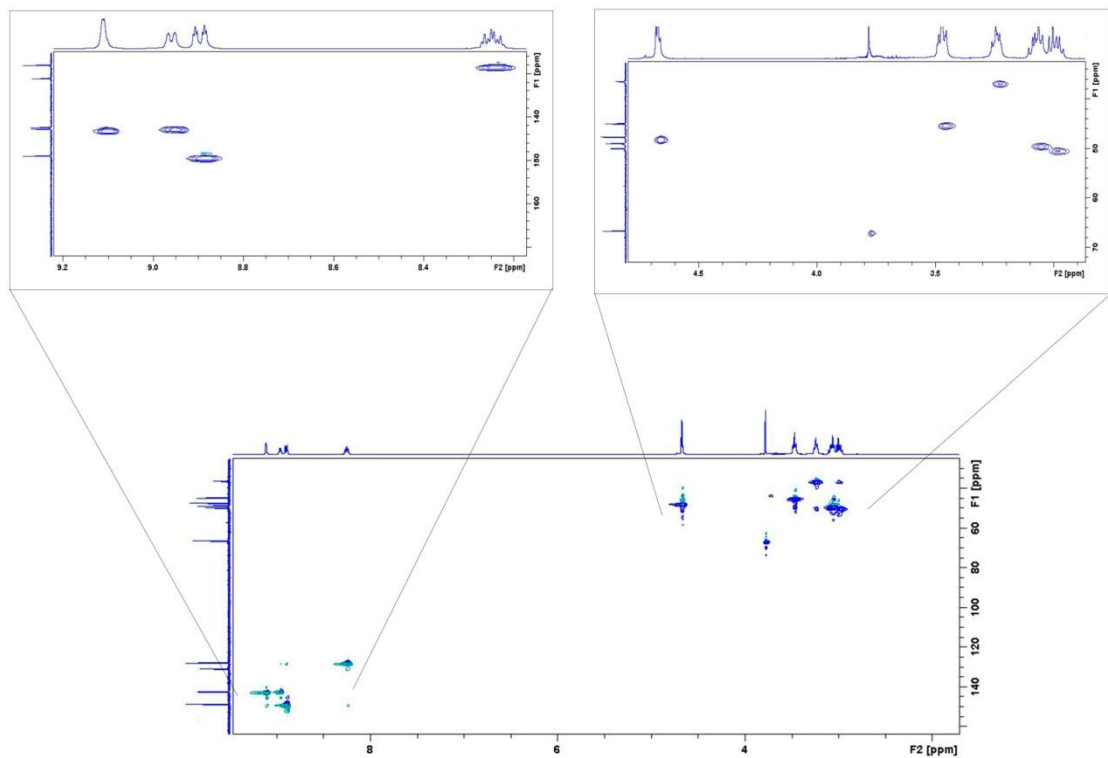


Figura D2 - Espectro de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC RMN do ligando D.

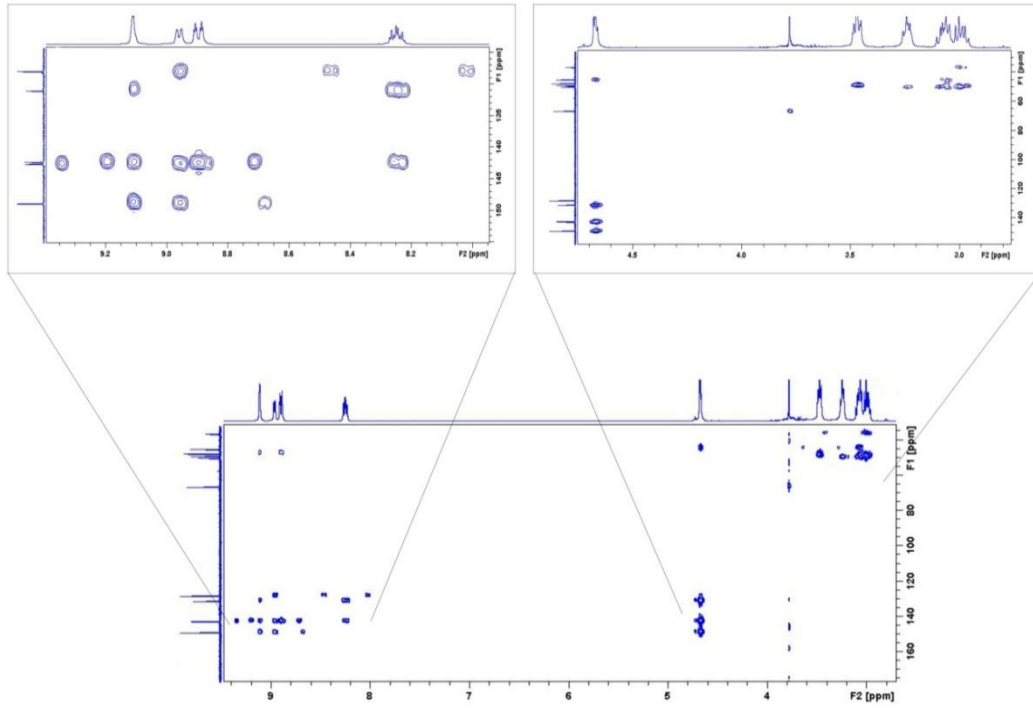


Figura D3 - Espectro de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC RMN de ligando D.