

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA POLITÉCNICA

RENAN DE JESUS PIVA  
VICTOR SARTORI ARIETA

ESTUDO DA ADSORÇÃO DE RNA EM RESINA FENÍLICA PARA USO EM  
CROMATOLOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

SÃO PAULO  
2014

RENAN DE JESUS PIVA  
VICTOR SARTORI ARIETA

ESTUDO DA ADSORÇÃO DE RNA EM RESINA FENÍLICA PARA USO EM  
CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Departamento de  
Engenharia Química como exigência para  
obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Rodrigues  
Azzoni

São Paulo  
2014

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por prover-me a força necessária para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, responsáveis pela minha formação, orientação e apoio, aos quais sou incansavelmente grato.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni, por sua gentil disponibilidade, atenção e paciência, assim como pela colaboração na revisão desta dissertação.

Ao meu amigo e coautor deste trabalho, Victor Sartori Arieta, pelo esforço, dedicação e motivação em sempre realizar o melhor possível.

À Universidade de São Paulo, à Escola Politécnica e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha graduação.

*Renan de Jesus Piva*

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu colega Renan de Jesus Piva, coautor da dissertação, que sempre mostrou disposição e empenho na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni, pelo constante suporte dado a nós, com colaboração, paciência e atenção necessários à condução deste trabalho.

A minha mãe, Cristina, e meu pai, Francisco, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas, ajudando-me a trilhar os caminhos que sonhei.

Aos amigos que, indiretamente, contribuíram muito ao mostrar carinho e atenção sempre que precisei.

*Victor Sartori Arieta*

"The scientist is motivated primarily by curiosity and a desire for truth."

(Irving Langmuir, Prêmio Nobel de 1932, Estocolmo)

## RESUMO

Avanços consideráveis em pesquisas sobre terapia gênica têm gerado uma necessidade cada vez maior de produzir vetores capazes de realizar a entrega gênica de maneira eficaz. Os vetores não-virais, como os plasmídeos, possuem características como baixo custo e simplicidade de produção, mas são menos eficazes que os vetores virais no que se refere à transfecção das células. Assim, são necessárias grandes quantidades de plasmídeos contendo altíssima pureza e alta resolução em sua isoforma superenovelada para garantir a eficácia dos tratamentos. Ainda que produzir DNA plasmidial em grandes quantidades não seja mais um desafio, sua purificação ainda representa uma barreira a ser superada, com a necessidade de processos de purificação (downstream) viáveis e que adequem o produto às exigências de qualidade postuladas por órgãos de saúde, como o FDA ou EMEA. Dentre esses processos, o de cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) possibilita a obtenção de plasmídeos com alta pureza e resolução, explorando a diferença de hidrofobicidade entre o pDNA, que é produto desejado, e as principais impurezas produzidas no seu processo de fabricação, usualmente RNA, gDNA, endotoxinas e proteínas. Geralmente, esse processo cromatográfico ocorre de maneira negativa, isto é, são as impurezas que adsorvem na matriz estacionária. Este trabalho focou no estudo do equilíbrio presente na adsorção de RNA, uma das principais impurezas, em resina fenólica voltada para uso em CIH. Para tal, células de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo pVAX1GFP foram cultivadas e lisadas. O lisado, já neutralizado e clarificado, foi precipitado com isopropanol a 25%, para que se concentrasse mais RNA. O pellet resultante dessa precipitação foi resuspendido em buffer Tris-HCl com pH = 8,0 e a ele foi adicionado sulfato de amônio (sólido), de tal forma que sua concentração fosse igual a 2,5 M. A partir disso, diferentes soluções foram preparadas, com concentrações de RNA variando de 5 ng/μl a 400 ng/μl. Essas soluções foram colocadas em contato com a resina de Phenyl-Sepharose 6 FF (low sub) por aproximadamente 3 horas. Mediu-se a concentração de RNA em solução antes e depois do processo, a fim de se verificar a quantidade adsorvida na resina fenólica. Os resultados mostraram que, assim como o esperado, quanto maior a concentração inicial de RNA, maior foi a quantidade adsorvida. No entanto, nos testes realizados, não foi possível detectar uma capacidade máxima de adsorção

da resina. Ainda assim, os resultados apresentaram indícios de que a adsorção de RNA em resina Phenyl Sepharose não ocorre de forma específica, isto é, em única camada.

Palavras-chave: Adsorção em Phenyl Sepharose, Cromatografia de Interação Hidrofóbica, Purificação de pDNA, Terapia Gênica.

## ABSTRACT

Gene therapy is a topic that is being vastly discussed due to major improvements recently. Those advances have come up with the need for high quality vectors capable of performing transfections efficiently. Non-viral vectors, such as plasmids, are characterized by both their low production costs and complexity, though they are less effective in delivering the transfection properly. Therefore, extremely high amounts of pDNA are needed with very high purity standards, as well as good resolution, when it comes to their different isoforms, since the supercoiled one (sc) is preferred instead of the others. Even though plasmid DNA production in high quantities is not an issue, its purification step still remains a challenge, since commercially available downstream processes that are capable of producing pDNA that meets the regulatory requirements (such as FDA or EMEA) are expensive and make them unprofitable. In this scenario, Hydrophobic Interaction Chromatography has shown great potential to overcome the problem. This technique is capable of purifying pDNA in high-resolution standards and its separation principle relies on the hydrophobicity difference between pDNA (which is the desired product) and impurities such as RNA, gDNA, endotoxins and proteins. Usually, HIC processes occur in a negative configuration, that is, the impurities adsorb into the stationary matrix, so pDNA can pass by and be thoroughly purified.

This work is aimed at studying the equilibrium found in the adsorption of RNA into a Phenyl Sepharose matrix to be used in HIC. To do so, *Escherichia coli* cells, already transformed with the plasmid pVAX1GFP, were cultivated, harvested and lysed. The neutralized lysate was precipitated using isopropanol (25% in volume), so the RNA could be concentrated. The pellet that was obtained in the precipitation was resuspended in Tris-HCl buffer at pH = 8,0. To that, solid sodium sulfate was added at 2,5 M. From that, different solutions were prepared, with RNA concentrations ranging from 5 ng/ $\mu$ l to 400 ng/ $\mu$ l. Those solutions were kept in contact with the Phenyl-Sepharose 6 FF (low sub) for approximately 3 hours. RNA concentration was measured before and after the contact, in order to determine the amount of RNA adsorbed into the resin.

The results showed that, as expected, the higher the initial RNA concentration, the higher was the amount adsorbed. However, it has not been possible to determine the maximum capacity of the resin from the tests that were run. Still, those results

have indicated that, most likely, RNA adsorption into Phenyl Sepharose resin occurs in a non-specific manner, that is, not in a single layer.

Key words: Phenyl Sepharose Adsorption, Hydrophobic Interaction Chromatography, pDNA purification, gene therapy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa genérico de DNA plasmidial (LIMA, 2008) .....	21
Figura 2: Diferentes isoformas de DNA plasmidial (LIMA, 2008).....	22
Figura 3: Principais etapas na produção de pDNA, em pequena e larga escala. Adaptado de Ferreira et al. (2000).....	23
Figura 4: Principais tipos de cromatografia para purificação de pDNA em larga escala (Adaptado de manuais da GE Healthcare, USA).....	26
Figura 5: Comportamento da adsorção de biomoléculas de proteínas em matrizes estacionárias por interação hidrofóbica. Adaptado de McCue (2009) .....	29
Figura 6: Diferentes tipos de isotermas de adsorção. Adaptado de SANHUENZA, 2001.....	31
Figura 7: Mapa do vetor plasmidial pVAX1GFP (Azzoni et al., 2007).....	33
Figura 8: Representação esquemática da resina de Phenyl Sepharose com o ligante hidrofóbico fenil (GE Healthcare, Suécia).....	34
Figura 9: Acompanhamento do crescimento celular de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ transformada com o plasmídeo pVAX1GFP, em meio LB, via medidas de absorbância em comprimento de onda igual a 600 nm. ....	36
Figura 10: Fase exponencial do cultivo celular. ....	38
Figura 11: Massa de adsorbato retido na estacionária em função da concentração de equilíbrio observada ao fim do ensaio para concentrações iniciais de 5 a 75 ng/ $\mu$ l de adsorbato. ....	40
Figura 12: Massa de adsorbato retido na estacionária em função da concentração de equilíbrio observada ao fim do ensaio para concentrações iniciais de 100 a 400 ng/ $\mu$ l de adsorbato.....	41
Figura 13: Linearização do modelo teórico de adsorção de Langmuir para os ensaios de adsorção com concentrações iniciais de RNA na faixa de 100 a 400 ng/ $\mu$ l. ....	42
Figura 14: Linearização do modelo empírico de adsorção de Freundlich para os ensaios de adsorção com concentrações iniciais de RNA na faixa de 100 a 400 ng/ $\mu$ l. ....	43
Figura 15: Eletroforese feita em matriz de agarose a 0,8% .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição típica do lisado neutralizado obtido após cultivo em batelada de <i>E.coli</i> . .....	15
Tabela 2: Critérios de pureza de pDNA com aplicação em terapia gênica. ....	15
Tabela 3: Vetores utilizados em pesquisas clínicas.....	19
Tabela 4: Principais tipos de cromatografia líquida usados na purificação de pDNA para entrega gênica. ....	27
Tabela 5: Tampões preparados para os experimentos.....	32
Tabela 6: Parâmetros de Langmuir e Freundlich para a adsorção de RNA em resina fenólica Phenyl Sepharose 6 FF (low sub).....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>gDNA</b>	DNA genômico
<b>pDNA</b>	DNA plasmidial
<b>pDNA sc</b>	DNA plasmidial na forma super enovelada
<b>pDNA oc</b>	DNA plasmidial na forma circular aberta
<b>CHI</b>	Cromatografia de interação hidrofóbica
<b>HIC</b>	Hydrophobic Interaction Chromatography
<b>h</b>	Unidade de tempo “horas”
<b><math>\mu_{\text{máx}}</math></b>	Taxa específica de crescimento máxima ( $\text{h}^{-1}$ )
<b><math>\mu</math></b>	Taxa específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
<b><math>t_d</math></b>	Tempo de duplicação das células (h)
<b><math>q_e</math></b>	Soluto adsorvido no equilíbrio por unidade de adsorvente (mg/ml)
<b><math>C_{eq}</math></b>	Concentração de equilíbrio de soluto na solução (ng/ $\mu\text{l}$ )
<b><math>Q_0</math></b>	Capacidade máxima de adsorção de Langmuir
<b><math>K_l</math></b>	Constante de adsorção de Langmuir
<b><math>K_f</math></b>	Constante de adsorção de Freundlich
<b>n</b>	Inverso da intensidade de adsorção de Freundlich
<b><math>R^2</math></b>	Coefficiente de correlação linear

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
2.1	Terapia e Vacina Gênicas	18
2.2	Vetores para entrega gênica	19
2.3	Plasmídeos	20
2.4	Produção de pDNA em larga escala e seus desafios	23
2.5	A cromatografia líquida no contexto da purificação de pDNA em larga escala	25
2.6	Purificação de Plasmídeos através da Cromatografia por Interação Hidrofóbica	28
2.7	Isotermas de Adsorção	30
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1	Preparação das Soluções Tampão	32
3.2	Cultivo Celular e Lisado Neutralizado	32
3.3	Adsorção do RNA	34
3.4	Resina de adsorção	34
3.5	Ensaio de Adsorção	35
3.6	Eletroforese em Gel de Agarose a 0,8%	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
4.1	Cultivo Celular	36
4.2	Recuperação e Purificação do RNA	39
4.3	Testes de adsorção em resina Phenyl Sepharose	40
4.4	Eletroforese do lisado neutralizado e do RNA purificado	43
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>46</b>
5.1	Cultivo celular	46
5.2	Lise celular e precipitação com isopropanol	46
5.3	Testes de adsorção com resina fenólica	46
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Vacinas ou terapias gênicas são formas inovadoras de se lidar com doenças e têm mostrado grande potencial como uma nova técnica de tratamento. O princípio básico de seu funcionamento está na introdução, nos pacientes, de genes funcionais que complementem ou substituam aqueles que sejam defeituosos, a fim de que proteínas de interesse sejam expressas. Esses genes frequentemente se apresentam como DNA na forma de plasmídeos (pDNA). A inserção (ou transfecção) desse material genético ocorre, por exemplo, de forma intramuscular, e, uma vez incorporado ao material genético das células-alvo, leva à produção de proteínas antigênicas que combatem ou previnem a doença em questão. Atualmente, o câncer é a doença mais comumente tratada via terapia gênica (WIRTH; PARKER; YLA-HERTTUALA, 2013) e o campo de aplicação dessas vacinas estende-se a doenças infecciosas, doenças cardiovasculares e desordens genéticas (IBRAHEEM; ELAISSARI; FESSI, 2014). Existem inúmeras vantagens presentes no uso de plasmídeos nesses tratamentos, como manufatura simples, alta estabilidade, baixa toxicidade, além da possibilidade de poder introduzir uma maior quantidade de genes em cada aplicação. No entanto, apesar dessas vantagens, plasmídeos não penetram de forma eficiente nas células, devido ao seu tamanho grande e sua hidrofiliçidade (DE LA VEGA, 2013).

Assim, há a motivação de se obter, cada vez mais, pDNA de alta pureza e em grande quantidade. Geralmente, os plasmídeos que contêm o gene de interesse são obtidos após fermentação em bactérias (ou outros microorganismos), em um ambiente controlado de temperatura e agitação. No entanto, o material genético é um constituinte intracelular e, dessa forma, exige-se não só que as células sejam lisadas, mas ainda que, após o produto intracelular seja obtido, o plasmídeo seja purificado do resto. Geralmente, o lisado (que é neutralizado) contém proteínas, endotoxinas, RNA, DNA genômico (gDNA) e plasmidial (pDNA), conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1: Composição típica do lisado neutralizado obtido após cultivo em batelada de *E.coli*.

Conteúdo do lisado após fermentação	% em massa
<b>Proteínas</b>	55
<b>RNA</b>	21
<b>gDNA</b>	3
<b>pDNA</b>	3
<b>Endotoxinas</b>	3
<b>Outros</b>	15

Um dos desafios da purificação de pDNA no lisado está relacionado ao fato de as impurezas possuírem características físico-química muito semelhantes às do produto desejado. A respeito disso, a agência reguladora americana *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) e europeia *European Medicines Agency* (EMA) recomendam valores máximos de impurezas praticáveis para que o produto - o plasmídeo voltado para a terapia ou vacina gênica – esteja o mais livre de impurezas possíveis, garantindo operações seguras e eficientes. Os critérios de pureza aceitáveis estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Critérios de pureza de pDNA com aplicação em terapia gênica.

<b>IMPUREZA</b>	<b>LIMITE ACEITO (% massa)</b>
Proteínas	< 0,5%*
gDNA	<1%*
RNA	<1%*
Endotoxinas	<10 EU/mg plasmídeo

\*Segundo critérios da agência de saúde americana (FDA, 2007).

Caso essa regulação não seja respeitada, efeitos adversos podem surgir, como alergias às proteínas, danos musculares provocados pelo gDNA, entre outras, que podem ser devidas uma combinação de fatores. Além desses efeitos não-desejáveis, a presença de impurezas pode afetar a eficiência da transfecção do plasmídeo nas células-alvo, já que a interação destas com o plasmídeo pode

levar a uma alteração de suas estruturas secundária e terciária. Motiva-se, por conseguinte, que a purificação de pDNA seja feita com maior recuperação possível, garantindo eficiência nos tratamentos que fazem uso dele, além de baratear esses processos, tornando-os cada vez mais acessíveis.

Em pequena escala, a purificação de pDNA é um processo relativamente simples e já dominado, com o uso de kits específicos para esses fins. No entanto, esses procedimentos geralmente fazem uso de componentes como enzimas (por exemplo, RNase que provêm de células animais), tornando o processo em larga escala inviável sob o ponto de vista econômico. Dessa forma, no que se refere à produção de pDNA em larga escala, os processos cromatográficos representam uma alternativa viável e comumente praticada, já que possibilitam a realização dessa operação com custos inferiores, além de eficiências desejáveis.

A exemplo disso está a Cromatografia por Interação Hidrofóbica (CIH), que é capaz de separar moléculas como RNA e gDNA desnaturado do pDNA, com grande potencial (CAMELO-NUNES et al., 2014). Isto é possível graças à diferença de hidrofobicidade entre as primeiras moléculas e segunda. O RNA e o gDNA desnaturado são moléculas que possuem estruturas de fitas simples, fazendo com que suas bases nitrogenadas fiquem mais expostas e propensas à interagirem com a matriz da coluna, de material hidrofóbico (STADLER; LEMMENS; NYHAMMAR, 2004). Usualmente, há uma etapa anterior de precipitação de RNA, proteínas e endotoxinas, o que é feito com substâncias como o isopropanol, reduzindo substancialmente a concentração destes antes de fazer o uso da coluna propriamente dita, para que essa não atinja a capacidade máxima antes que a maioria das impurezas tenha sido removida. O processo de Cromatografia por Interação Hidrofóbica exige o uso de um buffer (ou tampão), geralmente constituído de cloreto de sódio e sulfato de amônio, que garante que as interações entre os constituintes da matriz e as biomoléculas ocorram de forma adequada. Existe uma questão ambiental no que diz respeito ao uso do sulfato de amônio, já que é necessário tratar o efluente que contém esse sal em alta concentração antes de descartá-lo; há uma restrição em que o limite para se descartar amônio em resíduos biológicos não deve passar de 200 mg/l (BONTURI et al., 2013). Com a visão do processo de larga escala, isso pode representar uma barreira ao uso do sulfato de amônio, abrindo portas para o uso de outros sais, como citrato de sódio e fosfato de potássio.

O processo de Cromatografia por Interação Hidrofóbica já é utilizado com sucesso para a separação de proteínas, mas seu uso ainda é restrito e pouco estudado para o uso com material genético e, dado seu potencial, motiva-se a investigação sobre o tema. Além disso, outra questão relevante é a busca por uma melhor alternativa para o buffer a ser utilizado, dada a importância para a questão ambiental nos processos industriais.

Este trabalho, portanto, é focado no estudo de adsorção de RNA, a principal impureza a ser tratada, em uma resina para uso em Cromatografia por Interação Hidrofóbica. O estudo elucidará o modelo de adsorção de RNA na resina, incluindo seu devido equacionamento. Assim, pode-se entender melhor o processo pelo qual o pDNA é purificado e, dessa forma, mais eficientemente projetar sistemas de purificação de material genético em larga escala.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Uma revisão bibliográfica está apresentada nos tópicos desse capítulo, que inclui desde uma visão geral do contexto do trabalho até aspectos mais específicos do tema.

### **2.1 Terapia e Vacina Gênicas**

Vacinas tradicionais são aquelas em que o agente causador da doença (patógeno), ou fragmentos e toxinas dele, é inserido no paciente, de forma inativa ou enfraquecida. Dessa forma, o sistema imunológico de quem recebe a vacina é ativado, produzindo antígenos/anticorpos capazes de combater esse agente. Com isso, a memória do sistema imunológico é incitada, de forma que o organismo já estará preparado para combater a doença caso haja infecção.

Ainda que as vacinas tradicionais já estejam bem estabelecidas em todo o mundo, com grande aceitação por parte das populações e alta eficácia no combate a diversas doenças infecciosas - como, por exemplo, o sucesso na erradicação total da varíola no mundo - existem limitações e problemas consideráveis para esse tipo de imunização. Um fator importante reside na possibilidade de que o agente patológico atenuado que está presente na vacina tradicional sofra mutações ou se torne ativo novamente, o que levaria à infecção ou contratação da doença ao paciente que recebesse essa vacina. Um exemplo desse risco está nas dificuldades no desenvolvimento de vacinas desse tipo para o HIV, que ainda é uma doença sem cura. Além disso, em pacientes cujo sistema imunológico esteja enfraquecido, como aqueles que tem câncer ou mesmo o vírus do HIV, essas vacinas podem gerar efeitos adversos ou indesejáveis, diminuindo sua eficácia.

Nesse contexto, a descoberta da capacidade das células em incorporar material genético exógeno (que não pertence originalmente a elas) e expressá-lo, produzindo as proteínas correspondentes, impulsionou fortemente o desenvolvimento da terapia gênica. Essa modalidade de terapia foca na entrega de genes a células capazes de prevenir ou tratar doenças. No caso das vacinas gênicas, o material genético que é inserido nas células do paciente leva a produção das proteínas correspondentes ao agente causador da doença, ativando o sistema imunológico do paciente. No caso do tratamento de doenças genéticas, o intuito da terapia gênica é entregar genes funcionais que corrijam as mutações genéticas no

genoma do paciente que levaram à produção de tumores. Dessa forma, a terapia gênica foca na entrega de genes funcionais com funções terapêuticas ou profiláticas, sendo que essa entrega deve ser feita através de vetores, isto é, agentes que desempenhem a função de conduzir os genes de interesse às células-alvo.

## 2.2 Vetores para entrega gênica

Os vetores para entrega gênica podem ser virais ou não virais. Os virais representam a grande maioria dos estudos na área de terapia gênica, devido à elevada eficiência em introduzir fragmentos de DNA no interior de células, bem como consolidado conhecimento sobre o assunto (WATANABE; NASU; KUMON, 2014). No entanto, ainda que seja eficiente, o uso de vetores virais é de elevado custo de produção e, além disso, pode apresentar a possibilidade de recombinação, bem como produzir respostas imunológicas nos pacientes de alta gravidade. Assim, apesar de fatores favoráveis, esses vetores também possuem diversas limitações (HOARE et al., 2005). A Tabela 3 lista os principais vetores utilizados em pesquisas de terapia gênica.

Tabela 3: Vetores utilizados em pesquisas clínicas.

<b>Sistema de Entrega</b>	<b>% de uso em testes clínicos**</b>
Vírus*	68,4
pDNA	15,2
Lipídios Catiônicos	8,6
"Gene gun"	0,5
Outros	7,3

\*Vetores virais incluem Retrovírus, Adenovírus, Poxvírus, entre outros.

\*\* Valores referentes a dados de 2011.

Entre os vetores não-virais, destaca-se o uso de pDNA, que são pequenos fragmentos de DNA na forma circular, tendo como característica a capacidade de

se replicar independente. A seção a seguir apresenta os principais conceitos e definições de DNA plasmidial. Devido a seu histórico de uso seguro e custo relativamente baixo de produção, o uso de pDNA tem recebido atenção no que se refere à terapia gênica. No entanto, uma das limitações do seu uso é a baixa eficiência deste vetor em realizar a transfecção do gene em questão (AZZONI et al., 2007). Dessa forma, há a necessidade de se produzir pDNA em grandes quantidades, exigindo processos de purificação de larga escala, que sejam eficientes e rentáveis. Estima-se que, por dose, são necessários 5 miligramas de pDNA por quilo de massa corporal do paciente (RAIADO-PEREIRA et al., 2014). Além disso, o produto deve possuir alta qualidade para que sua aplicação em terapia gênica seja satisfatória.

### 2.3 Plasmídeos

Plasmídeos são moléculas de DNA de fita dupla, comumente de forma circular (ainda que sejam conhecidos exemplos na forma linear), que possuem a característica de replicação independente, sendo encontrados na forma livre no interior das células (BROWN, 2012). Essas biomoléculas, encontradas tanto em células procarióticas como eucarióticas, carregam um ou mais genes que conferem vantagens adaptativas ao hospedeiro. Ainda assim, sua presença não é essencial às células que habitam. De forma geral, um plasmídeo contém (LIMA, 2008):

Um **promotor** eucariótico forte, de origem viral;

**Sítios de clonagem**, nos quais é possível realizar a inserção de genes heterólogos em sua estrutura;

**Sequência de poliadenilação**, que é responsável pela estabilização a transcrição dos genes, além de tornar os promotores mais eficientes;

**Gene de seleção**, que geralmente confere resistência a antibióticos;

**Origem de replicação**, que é responsável por promover a replicação do plasmídeo em questão no interior da células. Essas características estão ilustradas na Figura 1.



Figura 1: Mapa genérico de DNA plasmidial (LIMA, 2008)

Quanto à sua conformação, os plasmídeos podem ter as seguintes isoformas:

**Superenovelada** (também conhecida como *sc* ou "*supercoiled*"), na qual ele está enrolado sobre si mesmo, em uma configuração compacta. Assim, essa é a forma mais encontrada de plasmídeos no interior de células, que corresponde a seu estado natural de conformação, sendo energeticamente mais favorável à replicação e transcrição de seus genes. Essa conformação pode ser positiva, na qual ele está enrolado no mesmo sentido das fitas duplas, para a esquerda, ou negativa, que é a mais comum em células bacterianas, na qual o enrolamento se dá na direção contrária, para a direita;

**Circular aberta** (também conhecida como *oc* ou "*open circular*"), que é formada quando, por exemplo, uma das fitas de um plasmídeo superenovelado é rompida, fazendo com que ele se torne relaxado e menor compacto;

**Linear**, que é formada quando o rompimento ocorre em ambas as fitas do plasmídeo e na mesma posição.

Além dessas isoformas, DNA plasmidial também pode estar na forma **denaturada**, na qual há um desemparalhamento das cadeias complementares, assim como ocorre com o DNA genômico.

Uma vez que possui conformação e, portanto, estrutura diferente, pDNA superenovelado é mais compacto que as demais isoformas. Assim, correndo um gel

de eletroforese, no qual as amostras percorrem uma matriz de agarose, que é um material poroso, pDNA sc irá migrar mais rapidamente - isto é, irá mais longe - que as demais conformações. Esse efeito está ilustrado Figura 2.

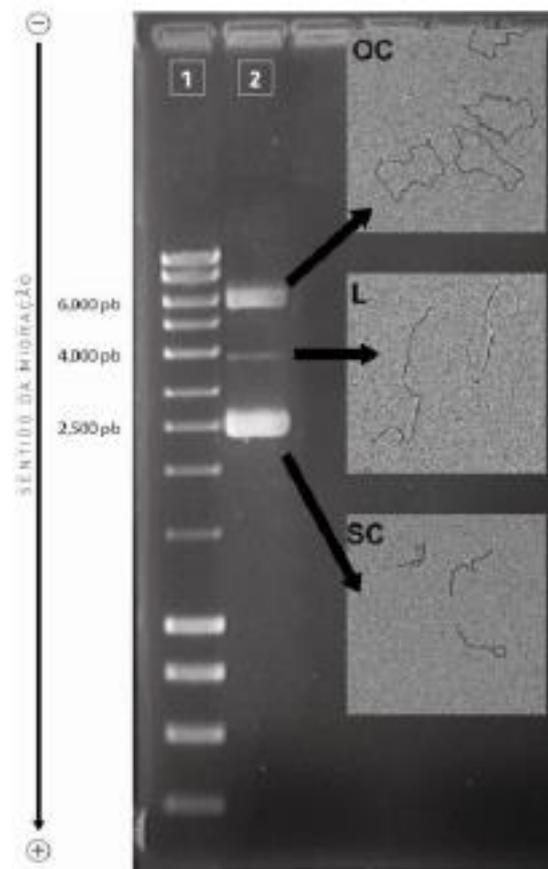


Figura 2: Diferentes isoformas de DNA plasmidial (LIMA, 2008).

No contexto de aplicação em terapia gênica, pDNA superenovelado com conformação superenovelada (pDNA sc) é mais eficiente na entrega gênica que as conformações circular e linear, uma vez que se trata de uma forma mais estável, com atividade biológica superior às demais. Assim, possuir pDNA com alta concentração/pureza em sua isoforma sc é um critério de qualidade, previsto, por exemplo, pela FDA, que exige que 90% de pDNA sc para aplicação em terapia gênica.

## 2.4 Produção de pDNA em larga escala e seus desafios

A produção de pDNA segue as etapas ilustradas na Figura 3.

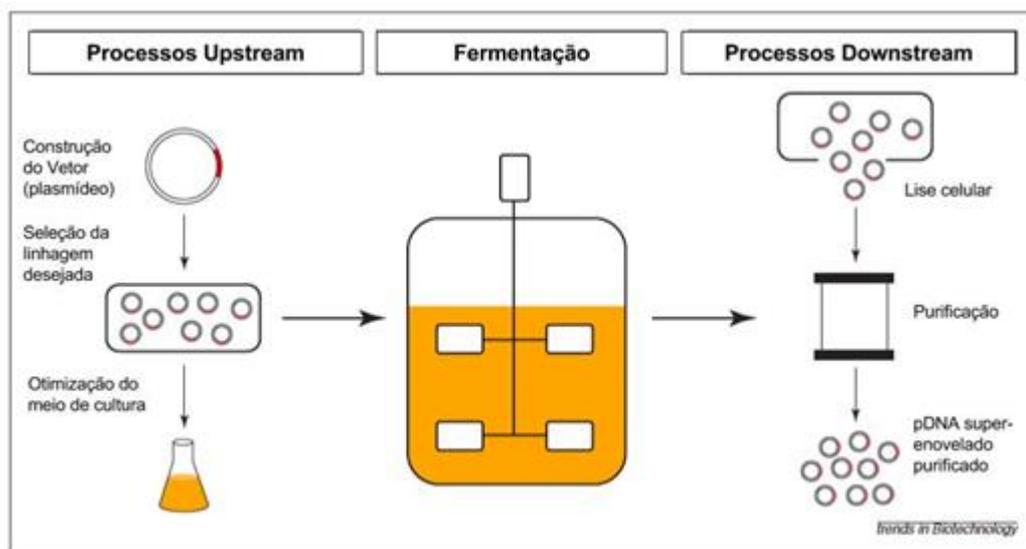


Figura 3: Principais etapas na produção de pDNA, em pequena e larga escala. Adaptado de Ferreira et al. (2000).

O primeiro passo para a produção de plasmídeos voltados para aplicação em terapia gênica é a construção do vetor a ser utilizado. Nele, deve estar contido o gene de interesse para a aplicação específica. Uma vez realizada essa etapa, devem-se transformar linhagens de *Escherichia coli* competentes para que elas contenham o vetor construído. Em posse da linhagem adequada transformada, deve-se otimizar o meio de cultura para seu crescimento, de tal forma que, quando cultivada, essa linhagem seja capaz de produzir o plasmídeo de interesse em grande quantidade, aumentando a produtividade do processo.

Em relação à produção em larga escala, o processo de produção de pDNA já está bem estabelecido (CARNES; WILLIAMS, 2007). Empregam-se os modos de operação em batelada e batelada alimentada. O último é especialmente útil para a produção de plasmídeos de alta qualidade (com conformação super-enovelada), pois permite que a taxa de crescimento da cultura seja controlada e mantida abaixo de seu valor máximo - isto é, operar o cultivo com um  $\mu < \mu_{max}$ , o que é possível graças à limitação de substrato no meio. Além disso, por manter a concentração de substrato em um valor relativamente baixo, altas densidades celulares são obtidas.

Já foram reportados processos com produção de pDNA em altas concentrações, chegando a 220 mg/l em alguns casos (PRATHER et al., 2003).

Em relação à purificação de pDNA em larga escala, existem algumas barreiras a serem vencidas. Após a conclusão da fermentação de *E.coli*, é necessário realizar a lise das células obtidas, uma vez que os plasmídeos se encontram dentro delas. Isto é, essa etapa é a de captura do produto desejado. Existem, basicamente, duas categorias de métodos para realizar a lise celular: os físico-mecânicos e os químicos. Dentre os físico-mecânicos, o método mais utilizado é o de rompimento por calor. Já dentre os químicos, destaca-se a lise alcalina. É importante que essa etapa do processo seja realizada de tal forma a não danificar nem os plasmídeos (já que esse é o produto desejado) nem o DNA genômico das células, uma vez que, se fragmentado, a separação desses componentes é dificultada e, conseqüentemente, qualidade do produto final é comprometida (PRAZERES et al., 1999).

Uma vez realizada a lise celular, é necessário retirar todas as impurezas presentes no lisado obtido. Usualmente, precipita-se a maior parte do pDNA contido no lisado neutralizado com isopropanol a 0,7 volumes (DIOGO et al, 2000). Dessa forma, pode-se remover a fração não precipitada, que contém basicamente as impurezas indesejáveis ao produto final: proteínas, DNA genômico, endotoxinas e RNA. O precipitado, por outro lado, contém plasmídeo em alta concentração. Esse processo é denominado clarificação e concentração do produto, uma vez que grande parte de impurezas é removida, concentrando-se o produto desejado e diminuindo-se o volume do lisado resultante. No entanto, pelo fato da aplicação em terapia gênica exigir plasmídeos com altos valores de concentração e pureza, faz-se necessária uma sucessiva etapa de purificação, para refinar o produto obtido e adequá-lo às exigências das agências reguladoras (FDA para os EUA e EMEA para a União Européia), ilustrado na Tabela 2.

Em pequena escala, essa etapa de refino (também denominada de polimento) é geralmente obtida com o uso de kits patenteados especificamente manufaturados para esse fim e utiliza diferentes enzimas, como RNases e DNases para degradar as impurezas. No entanto, por se tratar de um recurso caro e de difícil manipulação, seu uso fica restrito a escala laboratorial. Ainda sim, alguns estudos têm focado nesse contexto, com a criação de patentes de linhagens de

*E.coli* recombinantes capazes de expressarem essas enzimas necessárias para a degradação de impurezas (STADLER; LEMMENS; NYHAMMAR, 2004).

O maior desafio da purificação de pDNA em larga escala está na remoção de impurezas que possuam características físico-químicas semelhantes a ele, como RNA, gDNA e outras formas indesejáveis do próprio plasmídeo, como a linear, relaxada ou mesmo desnaturada (STADLER; LEMMENS; NYHAMMAR, 2004). Além disso, é preciso considerar que, ainda que já estejam consolidados processos eficientes e otimizados para maximizar a produção dos plasmídeos de interesse, o pDNA produzido corresponderá apenas a uma pequena fração dos produtos obtidos na fermentação, tipicamente menor que 3% em massa (RAIADO-PEREIRA et al., 2014).

## **2.5 A cromatografia líquida no contexto da purificação de pDNA em larga escala**

Uma operação cada vez mais estudada e utilizada no contexto de purificação de DNA plasmidial em larga escala visando aplicação em terapia gênica é a cromatografia líquida. Pelo fato de as agências reguladoras exigirem plasmídeos de altíssimas purezas e pelo menos 90% de pDNA na forma super-enovelada, operações como precipitação seletiva com álcoois não são suficientes para entregar o produto nas especificações exigidas. Nesse contexto, processos cromatográficos têm demonstrado a capacidade de atender aos critérios de pureza exigidos.

Existem diversas modalidades de cromatografia líquida que podem ser empregadas para purificar plasmídeos, como as de troca-iônica, afinidade, interação hidrofóbica e exclusão molecular (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005). A Figura 4 ilustra os diferentes tipos de cromatografia.

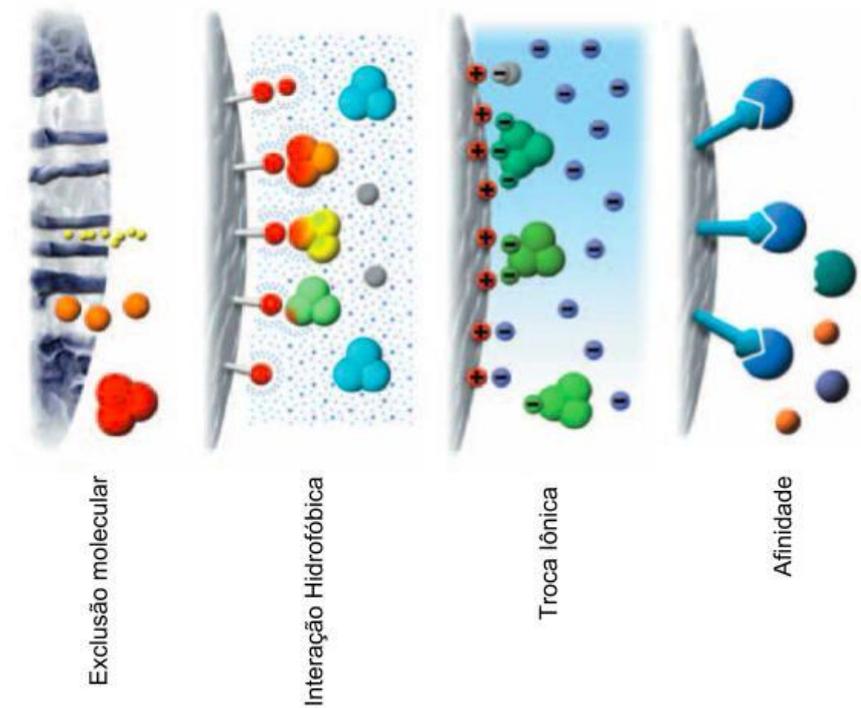


Figura 4: Principais tipos de cromatografia para purificação de pDNA em larga escala (Adaptado de manuais da GE Healthcare, USA)

Em maior ou menor grau, todas essas modalidades de cromatografia já foram estudadas com o objetivo de se purificar DNA plasmidial visando aplicação em terapia gênica (DIOGO; QUEIROZ; PRAZERES, 2005). A Tabela 4 lista as principais características de cada modalidade.

Tabela 4: Principais tipos de cromatografia líquida usados na purificação de pDNA para entrega gênica.

<b>Modalidade de Cromatografia</b>	<b>Força-motora</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Força-iônica	Diferença de carga entre pDNA e impurezas	Separação rápida, alta resolução das isoformas de pDNA	Baixa capacidade de separação entre pDNA e RNA e endotoxinas
Interação hidrofóbica	Diferença de hidrofobicidade entre pDNA e impurezas	Altas resoluções das isoformas de pDNA e boa separação das impurezas	Altas concentrações de sais necessárias
Afinidade	Diferença de afinidade biológica entre pDNA e impurezas	Possibilidade de se utilizar diferentes ligantes especificamente voltados para a aplicação em questão	Pouco usada para purificar pDNA; baixas purezas atingidas; processo lento
Exclusão molecular	Diferença de tamanho entre pDNA e impurezas	Boa separação entre pDNA, RNA e outras impurezas pequenas	Baixa resolução na separação das isoformas de pDNA

Dentre os tipos apresentados, a Cromatografia por Interação Hidrofóbica (CIH) tem apresentado resultados promissores na purificação de pDNA (BONTURI, 2011) e é a categoria de cromatografia abordada nesse trabalho, que será melhor descrita nos tópicos seguintes.

## **2.6 Purificação de Plasmídeos através da Cromatografia por Interação Hidrofóbica**

A CIH com o objetivo de se purificar proteínas é um processo bem estudado e estabelecido, com resultados muito satisfatórios do ponto de vista de pureza alcançada e eficiência do processo (BO et al., 2013). De fato, já existe no mercado uma série de resinas para o uso em CIH visando a purificação de proteínas. Já no contexto da purificação de pDNA em larga escala, o uso dessa operação é relativamente menos conhecido, ainda que muitos estudos voltados para investigação têm sido feitos, com resultados extremamente positivos (FREITAS; SANTOS; PRAZERES, 2009).

A cromatografia por interação hidrofóbica (CIH) utiliza o fato de que moléculas de pDNA possuem hidrofobicidade diferente das impurezas que precisam ser separadas, como RNA, gDNA, DNA denaturado, endotoxinas e proteínas. Essa diferença também é significativa para as diferentes conformações de DNA plasmidial, como a circular aberta e a linear.

O princípio envolvido na CIH está na interação entre os grupos apolares das moléculas da fase móvel com os ligantes apolares da fase estacionária (que estão imobilizados). Essas interações são favorecidas em altas concentrações de sais - também chamados de sais cosmotrópicos - que possibilitam que as moléculas de água responsáveis pela camada de hidratação das moléculas de proteína ou material genético se desloquem para o meio da solução. Assim, os grupos apolares das biomoléculas a serem adsorvidas tornam-se livres para se ligarem aos grupos apolares da fase estacionária, promovendo o processo de adsorção, que é termodinamicamente favorável nesse contexto. Diminuindo-se a concentração desses sais na solução, a eluição do material adsorvido na matriz estacionária é possível, garantindo sua recuperação de forma adequada. A Figura 5 ilustra esse comportamento para moléculas de proteína.

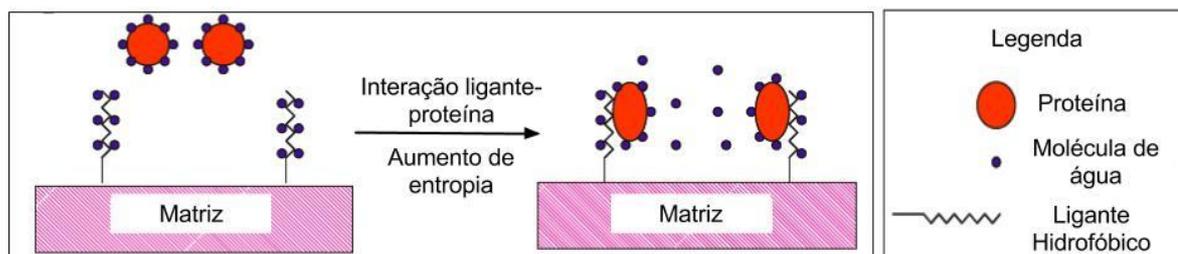


Figura 5: Comportamento da adsorção de biomoléculas de proteínas em matrizes estacionárias por interação hidrofóbica. Adaptado de McCue (2009)

Basicamente, existem dois modos de operação de CIH nesse contexto: a convencional e a negativa.

Na convencional, o DNA plasmidial (em sua forma superenovelada), isto é, o produto desejado, adsorve na matriz estacionária, sendo que sua recuperação é feita com a eluição, alterando-se a força iônica da solução.

Na negativa, são as impurezas que adsorvem na matriz, e o pDNA sai na fase de lavagem da coluna cromatográfica. O uso do modo convencional ou negativo depende da solução a ser purificada. Se a quantidade de impurezas for grande, é interessante que se promova a adsorção do produto desejado na matriz, já que este está em menor quantidade e, dessa forma, evita-se que a capacidade máxima de adsorção da coluna seja facilmente atingida, otimizando essa etapa de purificação. Estudos com ambos os modos de operação já foram estudados e mostram resultados positivos na recuperação de pDNA superenovelado (TRINDADE et al., 2005).

Um tópico que tem sido alvo de estudos recentes nesse contexto é a utilização de diferentes sais que promovam, de forma eficiente e seletiva, a purificação de pDNA por processos que envolvam CIH em uma de suas etapas. Usualmente, o sulfato de amônio é empregado para esse fim, com resultados positivos. Há relatos recentes do uso de citrato de sódio na literatura, também com resultados positivos (FREITAS; SANTOS; PRAZERES, 2009).

Em relação à matriz estacionária utilizada na CIH, estudos já foram realizados utilizando-se adsorventes de fenil-agarose (com alta e baixa substituição de ligantes), octil-agarose e butil-agarose (BONTURI, 2011) Desses, os de fenil-agarose se mostraram mais promissores na purificação de pDNA, capazes de purificá-lo com altas resoluções em relação às suas diferentes isoformas, o que confere uma importante e vantajosa característica desse processo: ainda que, em

sua grande maioria, se pDNA seja formado em cultivos celulares de *E.coli*, o grande número de etapas de processos *downstream* conferem um estresse à essas estruturas, e, inevitavelmente, as conformações circular e linear são formadas também e, portanto, faz-se necessário separá-las da superenovelada.

Em geral, uma grande vantagem do uso da cromatografia em processos de purificação é o fácil *scale-up* em processos de larga escala, além de excelente capacidade de remover impurezas indesejáveis, uma vez otimizadas as condições para a aplicação específica (DIOGO et al., 2000).

No entanto, no contexto de purificação de ácidos nucleicos com aplicação em terapia gênica, estudos do equilíbrio de adsorção dessas biomoléculas ainda não foram feitos. Assim, não se dispõe, por exemplo, de qual modelo de isothermas de adsorção é seguido, o que dificulta a predição de parâmetros como a capacidade máxima de adsorção de uma coluna, ou ainda do comportamento dela dependendo da concentração inicial de impurezas presente na solução a ser purificada.

## **2.7 Isothermas de Adsorção**

O estudo do equilíbrio de adsorção em cromatografia pode ser quantificado através da construção de isothermas de adsorção. Estas curvas podem ser obtidas através de experimentos com a solução a ser purificada (como impurezas ou o produto desejado) e o material adsorvente (como resinas para cromatografia). Para tal, soluções com diferentes concentrações do material a ser adsorvido são utilizadas, forçando-se o contato deste com a matriz imobilizada, até que se atinja o equilíbrio. Assim, medindo-se a concentração final do sistema, que é concentração de equilíbrio, pode-se estimar a quantidade, em massa, de material que foi adsorvido (SANHUEZA, 2001). Dessa forma, o conjunto de experimentos permite a construção das isothermas de adsorção, que, dependendo do mecanismo de adsorção, possuem diferentes comportamentos, sendo que alguns deles estão ilustrados Figura 6.

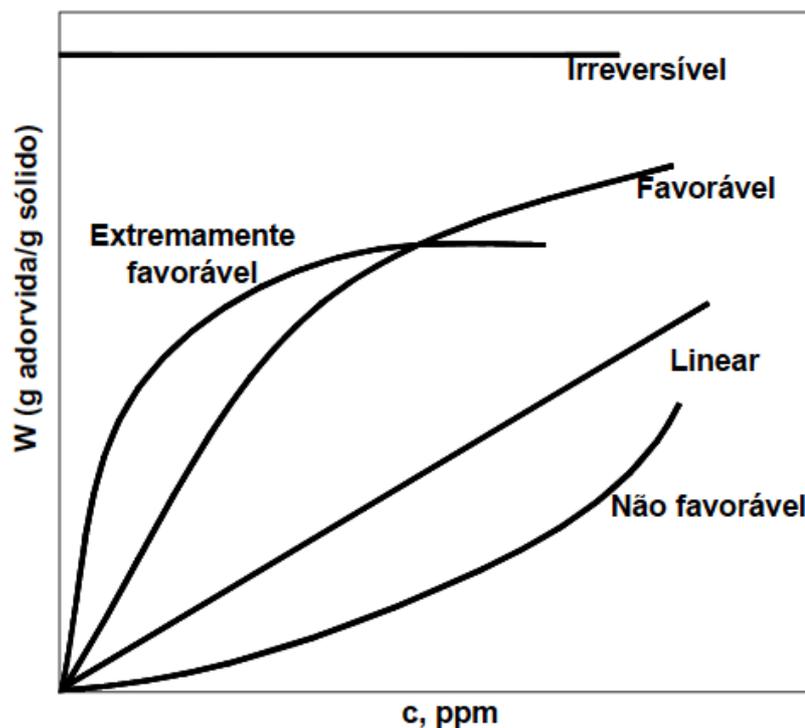


Figura 6: Diferentes tipos de isoterma de adsorção. Adaptado de SANHUIENZA, 2001.

Ainda que relativamente simples, essas curvas podem fornecer informações úteis para o *scale-up* de processos cromatográficos de biomoléculas, como a existência (ou não) de uma capacidade máxima de adsorção

Diversos fatores afetam as isoterma de adsorção, como o pH da solução, a temperatura e, principalmente, o tipo de adsorvente utilizado no processo.

O modelamento matemático das isoterma de adsorção permite a obtenção de parâmetros úteis para estimar a capacidade de materiais adsorventes para determinadas moléculas. Esse modelamento pode ser estendido para biomoléculas, como proteínas, pDNA e RNA. Em especial as duas últimas são de útil investigação dado o crescente uso de processos cromatográficos nos quais o fenômeno de adsorção está presente, como na CIH (SCHMOEGER et al., 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os métodos empregados no trabalho, que compreendem as etapas de preparação de soluções tampão, cultivo e lise celular, recuperação e purificação de RNA e testes de adsorção com resina fenólica. Essas etapas, listadas a seguir, contêm os respectivos materiais utilizados para a execução.

#### 3.1 Preparação das Soluções Tampão

Soluções tampão foram inicialmente preparadas para serem posteriormente utilizadas no processo de obtenção do lisado neutralizado, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5: Tampões preparados para os experimentos.

Tampão	Composição
1	10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l glicose, 10 mmol/l EDTA
2	200 mmol/l de NaOH e SDS 1% (m/v);
3	Acetato de potássio 3 mol/l com pH 5,5 corrigido com ácido acético glacial.
4	Sulfato de amônio M = 2,5 mol/l.

#### 3.2 Cultivo Celular e Lisado Neutralizado

Para a obtenção do lisado neutralizado foi realizado, inicialmente, o cultivo de células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competentes previamente transformadas com o plasmídeo pVAX1GFP, que está esquematizado na Figura 7.

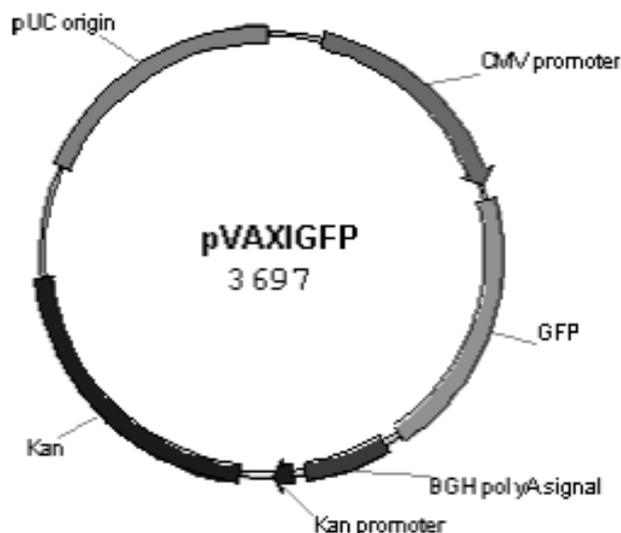


Figura 7: Mapa do vetor plasmidial pVAX1GFP (Azzoni et al., 2007).

Esse vetor possui um promotor viral (CMV), gene repórter (GFP), conferindo característica de produzir a proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*), gene de resistência ao antibiótico canamicina (Kan) e origem de replicação de procaríotos (pUC).

O inóculo foi preparado através da adição de 40  $\mu$ l de solução celular em 5 ml de meio de cultivo Luria Bertani (LB) e o frasco foi refrigerado a 4 °C pelo período de 16 horas, *overnight*, de forma a reduzir o tempo da fase lag do crescimento celular.

Na manhã seguinte, o inóculo foi diluído em 500 ml de meio LB contendo 0,5 ml de solução do antibiótico canamicina (30 mg/ml). O crescimento foi realizado por 8 horas em agitador C24 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, EUA) nas condições de 37 °C e 250 rpm e amostras foram retiradas a cada 30 minutos para determinar o fim da fase exponencial via medidas de absorbância ( $\lambda = 600$  nm) em espectrofotômetro (AJX-1000, Micronal). As células foram recuperadas por centrifugação, conduzida a 6000 g e 8 °C por 10 minutos.

Os *pellets* formados foram ressuspensos em 16 ml de tampão 10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/L glicose, 10 mmol/L EDTA. Em seguida, 16 ml de tampão 200 mmol/l de NaOH e SDS 1% (m/v) foram adicionados e a mistura foi deixada em temperatura ambiente por 10 minutos. Por fim, o lisado foi neutralizado com adição de 8 ml da solução de acetato de potássio 3 mol/l pH 5,5 corrigido com ácido

acético glacial. O lisado neutralizado foi refrigerado a 4 °C por 10 minutos e centrifugado (12000 g e 4 °C) por 50 minutos. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi separado e armazenado a -70 °C.

### 3.3 Adsorção do RNA

Ao lisado neutralizado foram adicionados 0,25 volumes de isopropanol. Baixas concentrações de isopropanol promovem a precipitação seletiva do RNA, de modo que o pDNA continue na fase líquida do lisado. A suspensão foi refrigerada a 4 °C por 90 minutos e, então, centrifugada (15.000 g, 4 °C) por 30 minutos.

Após a centrifugação, obtiveram-se *pellets* com alto teor de RNA. Então, os *pellets* foram ressuspensos com solução de sulfato de amônio 2,5 mol/l na proporção de 1 ml de sulfato de amônio para cada 8 ml de suspensão centrifugada. Em busca de se obter maiores recuperações de RNA, a solução de sulfato de amônio foi substituída por tampão Tris-HCl 10 mmol/l ph 8,0 e sulfato de amônio sólido foi adicionado para se obter uma concentração igual a 2,5 mol/l.

### 3.4 Resina de adsorção

A resina utilizada no estudo foi a Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub) (GE Healthcare, Suécia), contendo 25 µmol ligantes fenil/ml meio ligadas em matriz de agarose 6% composta por partículas esféricas de 90 µm de tamanho médio, conforme estudada por Bonturi, 2011 (Figura 8).

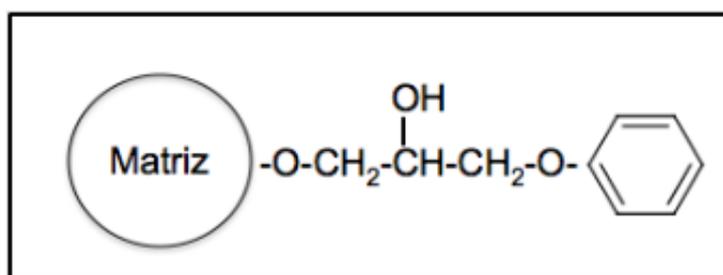


Figura 8: Representação esquemática da resina de Phenyl Sepharose com o ligante hidrofóbico fenil (GE Healthcare, Suécia).

### **3.5 Ensaios de Adsorção**

Para o levantamento da isoterma foram preparadas soluções, a partir do RNA previamente obtido, com diferentes concentrações de RNA, sendo elas iguais a 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 400 ng/ $\mu$ l.

A quantificação da adsorção foi realizada misturando-se 0,5 ml da solução com concentração conhecida de RNA a 10  $\mu$ l de resina Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub). A mistura foi mantida sob agitação branda e constante em Homogeneizador de Sangue AP 22 (Phoenix Equipamentos Científicos, Brasil) por 3 horas. Ao término do procedimento, as amostras foram centrifugadas (15000 g, 4 °C) por 15 minutos. *Pellets* da fase resina + RNA foram formados e o sobrenadante foi recuperado. A concentração de RNA na solução sobrenadante foi medida em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA), indicando a quantidade de RNA não adsorvida pela resina.

### **3.6 Eletroforese em Gel de Agarose a 0,8%**

Frações do lisado neutralizado e da solução concentrada em RNA foram submetidas a ensaios de eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (em massa) condizida durante 3 horas em equipamento apropriado (H33 Mini Horizontal Submarine Unit, Amersham Biosciences) alimentado a 60 V (Electrophoresis Power Supply - EPS 301, GE Healthcare). Foi utilizado o tampão de corrida Tris básico 40 mmol/l, ácido acético 20 mmol/l e EDTA 1 mmol/l, pH 8,0 (TAE).

O gel formado foi tratado com solução SYBR<sup>®</sup> Safe (Life Technologies, EUA) na proporção de 1:20000 (em volume) de água destilada. As bandas de ácidos nucleicos foram evidenciadas através de exposição à luz UV no sistema de imagem (Gel Logic 212 Pro, Carestream).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão discutidos os resultados obtidos referentes ao cultivo celular, à recuperação de RNA a partir da precipitação com isopropanol e, principalmente, à capacidade adsortiva da resina Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub) em relação ao RNA.

### 4.1 Cultivo Celular

Mesmo com a preparação prévia do inóculo, o cultivo celular apresentou uma fase *lag* (fase de crescimento lento) de aproximadamente 5 horas. O cultivo foi interrompido ainda na fase exponencial, para que a produção de pDNA e RNA pelas células estivesse ocorrendo em sua taxa máxima, permitindo a maior recuperação desses produtos posteriormente.

Ainda sim, o número final de células obtido foi inferior ao esperado, uma vez que, após 8 horas de cultivo a absorbância medida situou-se abaixo de 0,8, o que pode ser ilustrado pela extensa fase *lag* que apresentou.

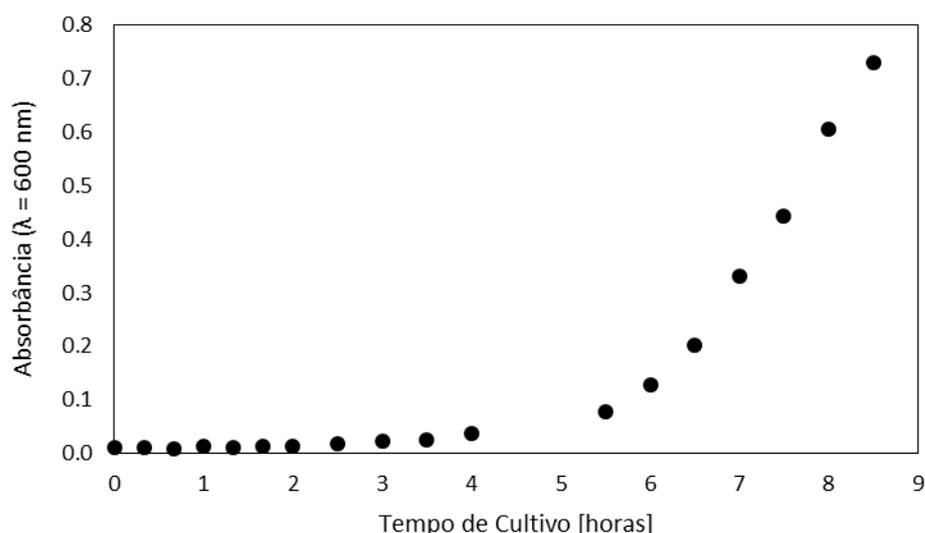


Figura 9: Acompanhamento do crescimento celular de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformada com o plasmídeo pVAX1GFP, em meio LB, via medidas de absorbância em comprimento de onda igual a 600 nm.

Os dados do cultivo celular foram tratados com o intuito de se estudar a cinética de crescimento da linhagem de *E.coli* utilizada. Na fase de crescimento exponencial, isto é, na qual a taxa específica de crescimento é máxima ( $\mu = \mu_{\text{máx}}$ ),

tem-se o seguinte balanço de massa (células), considerando o processo em batelada (VILLADSEN et al, 2011):

$$\frac{dN}{dt} = \mu \cdot N$$

(Equação 1)

Em que:

N é o número de células no meio no tempo t;

t é o tempo considerado, dado em h;

$\mu$  é taxa específica de crescimento, dada em  $h^{-1}$

Integrando-se a equação 1, tem-se:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = \mu \cdot t$$

(Equação 2)

Em que:

$N_0$  é o número de células no meio no tempo inicial;

Reranjando equação 2, tem-se que:

$$\ln(N) = \mu \cdot t + \ln(N_0)$$

(Equação 3)

A equação 3 permite que, obtendo os valores de N experimentalmente ao longo do tempo, seja calculado o valor da taxa específica de crescimento. Em termos práticos, a quantidade de células em um meio pode ser medida de várias formas, sendo nos experimentos deste trabalho utilizou-se a medida da densidade óptica a  $\lambda = 600\text{nm}$ , que é o valor típico para biomassa. Uma vez que os valores de absorvância representam a quantidade de células no meio proporcionalmente (MADIGAN et al, 2010), é possível reescrever a equação 3, obtendo-se a seguinte expressão:

$$\ln(DO_{600}) = \mu \cdot t + \ln(DO_{600})_{t=0}$$

(Equação 4)

Assim, considerando-se apenas os dados experimentais relativos à fase exponencial, isto é, o período de crescimento no qual a taxa específica de crescimento é máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ), pode-se construir o gráfico representado pela figura a seguir, em formato semilogarítmico.

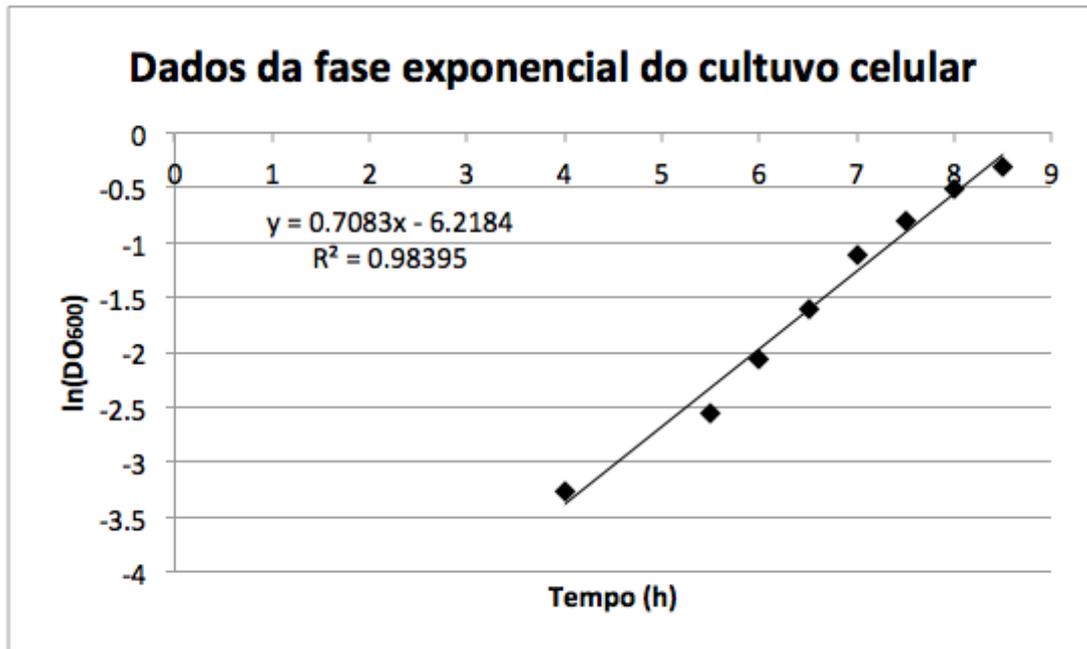


Figura 10: Fase exponencial do cultivo celular.

A linearização dos dados da Figura 9 fornece o valor de  $\mu_{\text{máx}} = 0,7083\text{h}^{-1}$ . Pode-se, a partir desse dado, calcular o tempo de duplicação das células ( $t_d$ ) no cultivo, de acordo com a equação a seguir.

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

(Equação 5)

Nesse caso, a partir da equação 5, obtém-se  $t_d = 0,98\text{h}$ . O valor da taxa específica de crescimento máximo obtido a partir dos dados experimentais apresentou-se ligeiramente abaixo dos encontrados na literatura, em meio LB, tipicamente em torno de  $0,9\text{h}^{-1}$  para linhagens de *E.coli* recombinantes

(BACHINGER; MÅRTENSSON; MANDENIUS, 1998), que tendem a crescer mais lentamente que as linhagens puras.

#### 4.2 Recuperação e Purificação do RNA

Inicialmente, a purificação de RNA foi realizada com 0,2 volumes de isopropanol. Após centrifugação, o pellet de RNA obtido foi resuspenso em uma solução de sulfato de amônio a 2,5 mol/l. A concentração de RNA no sobrenadante foi igual a 65,8 ng/μl, permitindo apenas a síntese de soluções com concentração até 50 ng/μl, número relativamente baixos para a construção de isotermas, uma vez que, em processos de larga escala, soluções com concentrações mais altas são tipicamente obtidas.

Buscando-se obter soluções de RNA mais concentradas, o processo de precipitação foi repetido adicionando-se, desta vez, 0,25 volumes de isopropanol, e o pellet novamente resuspenso em solução de sulfato de amônio a 2,5 mol/l. Foi possível, então, atingir uma concentração igual a 337,53 ng/μl. Soluções com concentração de RNA até 150 ng/μl foram preparadas. Ainda sim, as concentrações de RNA obtidas foram baixas.

Portanto, para que concentrações ainda mais altas pudessem ser obtidas, o método foi repetido pela terceira vez. Isopropanol foi utilizado novamente na proporção de 0,25 volumes, porém os pellets formados após centrifugação foram resuspendidos em solução Tris-HCl 10mmol/l com pH igual a 8,0 e sulfato de amônio sólido foi adicionado até que se obtivesse concentração igual a 2,5 mol/l.

A ressuspensão com Tris-HCl foi adotada buscando-se obter maior solubilização de RNA. De fato, a concentração de RNA na solução estoque resultante após este procedimento foi igual a 1390 ng/μl. Foi possível, desta forma, preparar soluções com teores de RNA até 400 ng/μl.

A baixa concentração de RNA obtida nos dois primeiros experimentos, quando a suspensão foi feita apenas com a solução de sulfato de amônio a 2,5M, pode ser explicada pelo fato de que esse sal promove o efeito de *salting in*, isto é, a precipitação de RNA é preferida em relação à dissolução no meio. Por isso, quando se utilizou o tampão Tris-HCl, a concentração de RNA obtida foi substancialmente superior.

### 4.3 Testes de adsorção em resina Phenyl Sepharose

Os ensaios de adsorção foram conduzidos com soluções de RNA de concentrações conhecidas na faixa de 5 a 400 ng/ $\mu$ l. Os resultados indicaram duas faixas com comportamentos distintos.

Soluções menos concentradas em RNA, 5 a 75 ng/ $\mu$ l, não apresentaram comportamento com tendência linear entre a quantidade de soluto adsorvido por volume de resina ( $q_e$ ) e a concentração de equilíbrio do soluto na solução ( $C_{eq}$ ). A variância nos resultados não permitiu identificar um padrão bem definido (Figura 11).

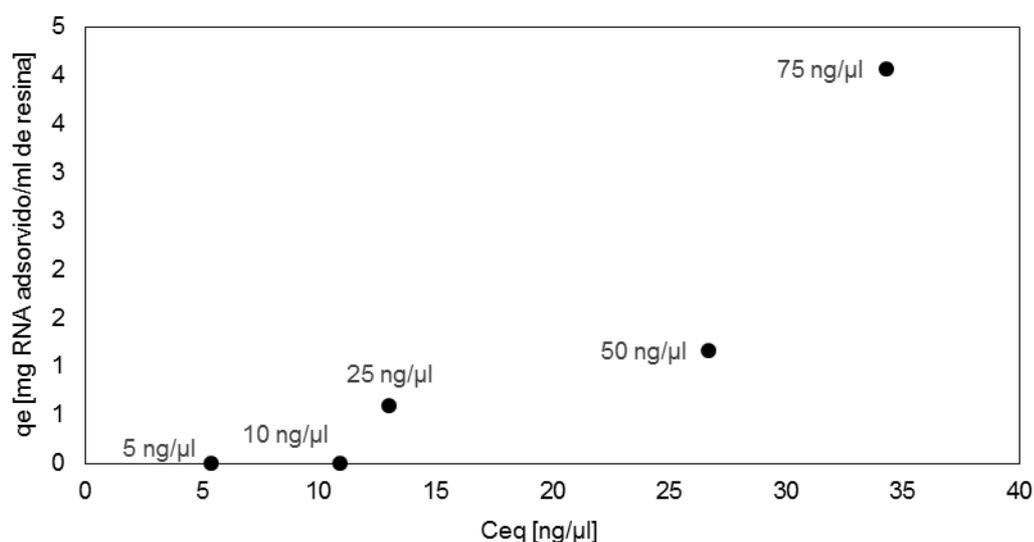


Figura 11: Massa de adsorbato retido na estacionária em função da concentração de equilíbrio observada ao fim do ensaio para concentrações iniciais de 5 a 75 ng/ $\mu$ l de adsorbato.

Soluções mais concentradas em RNA, 100 a 400 ng/ $\mu$ l, apresentaram um comportamento com tendência linear entre a quantidade de soluto adsorvido por volume de resina ( $q_e$ ) e a concentração de equilíbrio do soluto na solução ( $C_{eq}$ ), conforme apresentado na Figura 12.

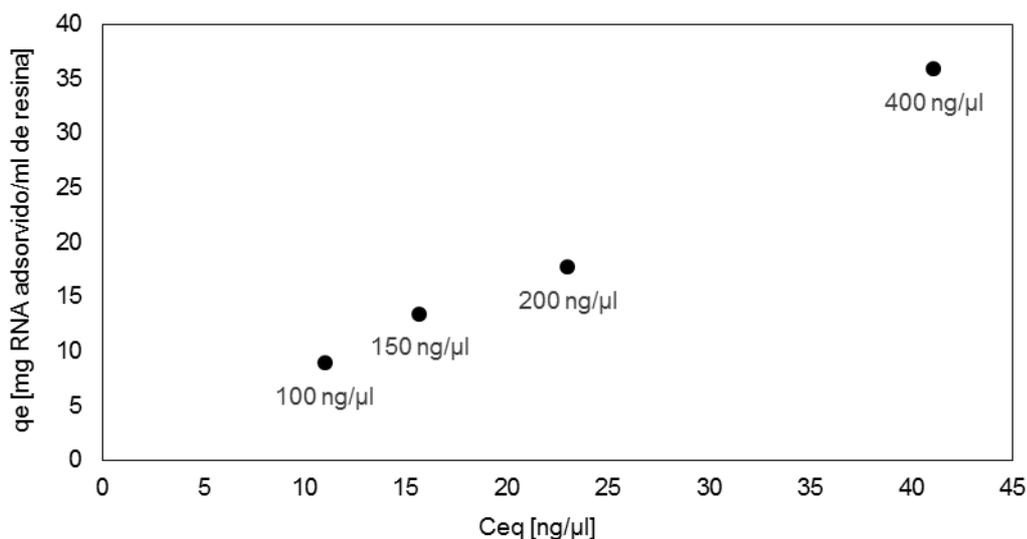


Figura 12: Massa de adsorbato retido na estacionária em função da concentração de equilíbrio observada ao fim do ensaio para concentrações iniciais de 100 a 400 ng/μl de adsorbato.

A comparação dos dois grupos distintos permitiu observar que soluções mais concentradas proporcionaram maior retenção de adsorbato na resina, como esperado. Para soluções mais concentradas, a concentração de equilíbrio obtida foi 10 vezes inferior à concentração inicial. Para as soluções mais diluídas, por outro lado, a concentração de equilíbrio permaneceu próxima à inicial.

Não foi possível, através dos resultados, identificar um patamar onde  $q_e$  se mantivesse constante independente do aumento de  $C_{eq}$ . Logo, a capacidade adsortiva máxima da resina não pode ser determinada. Ainda assim, os testes indicaram que a resina Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) adsorveu quantidades de RNA próximos a 40 mg/ml de resina utilizado. Esse resultado surpreende, tendo em vista os estudos já conduzidos com a mesma matriz no sentido de avaliar sua capacidade adsortiva perante algumas proteínas.

Hahn et al. (2003) investigaram a capacidade adsortiva, em testes dinâmicos, de diversas matrizes em relação à proteína albumina sérica extraída de bovinos (BSA). Para a resina Phenyl Saphrose 6 FF (low sub), obtiveram capacidade superior a 20 mg/ml em relação à BSA.

Uma vez que o RNA é uma molécula maior que as de proteínas, esperava-se que o adsorvente apresentasse um desempenho inferior quanto à retenção deste ácido nucleico. O resultado obtido, entretanto, foi oposto ao esperado. Isto pode ser um indício de que a adsorção de RNA em resina Phenyl Sepharose 6 FF

(low sub) ocorre através de uma interação não específica, de modo que múltiplas camadas de RNA sejam formadas sobre a superfície da resina.

A isoterma de Langmuir tem sido frequentemente utilizada em trabalhos acadêmicos para validação de modelos de adsorção devido à sua simplicidade e vasta aplicabilidade (BAJPAI, 2010). O comportamento apresentado pela resina deste trabalho, frente ao RNA, entretanto, não pode ser descrito pelo modelo proposto por Langmuir, uma vez que este modelo possui sua teoria fundamentada em adsorção em monocamada, ou seja, ele desconsidera a interação entre as moléculas do adsorbato. De fato, a regressão linear dos dados experimentais obtidos (Tabela 6), através da linearização do modelo de Langmuir (Equação 6), corrobora com a hipótese, ao exibir um comportamento que se distancia de uma reta (Figura 13).

$$\frac{C_{eq}}{q_e} = \left(\frac{1}{Q_0}\right)C_{eq} + \frac{1}{Kl * Q_0}$$

(Equação 6)

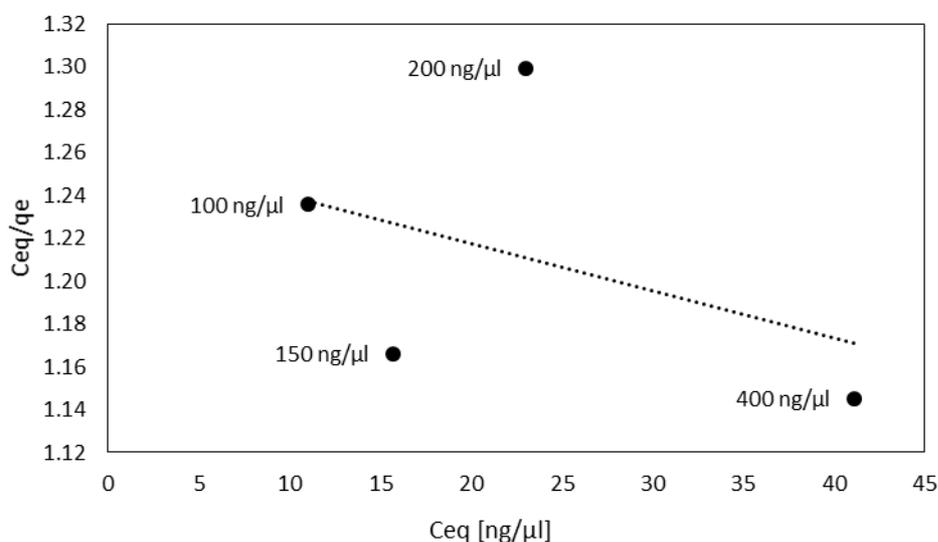


Figura 13: Linearização do modelo teórico de adsorção de Langmuir para os ensaios de adsorção com concentrações iniciais de RNA na faixa de 100 a 400 ng/μl.

Por outro lado, os resultados obtidos para as soluções com concentração de RNA entre 100 e 400 ng/μl permitiram um bom ajuste de parâmetros (Tabela 6), conforme exibido na Figura 14, através da equação de Freundlich (Equação 7).

Este modelo, por sua vez, foi desenvolvido empiricamente e não considera uniformidade (ALVES; REIS; HUNT, 2010), indicando, assim, que a adsorção estudada pode ocorrer de forma não específica.

$$\log(qe) = \frac{1}{n} \log C_{eq} + \log K_f$$

(Equação 7)

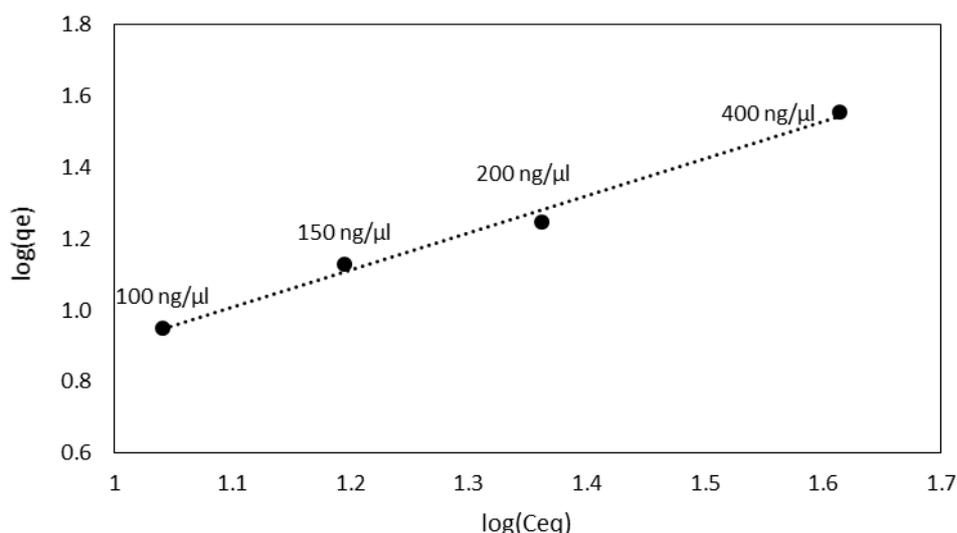


Figura 14: Linearização do modelo empírico de adsorção de Freundlich para os ensaios de adsorção com concentrações iniciais de RNA na faixa de 100 a 400 ng/μl.

Tabela 6: Parâmetros de Langmuir e Freundlich para a adsorção de RNA em resina fenólica Phenyl Sepharose 6 FF (low sub)

Parâmetros	Langmuir			Freundlich		
	R <sup>2</sup>	Q <sub>0</sub>	K <sub>l</sub>	R <sup>2</sup>	n	K <sub>f</sub>
Unidade		[mg RNA / ml Resina]	[ml Solução / mg RNA]			[mg RNA/ ml Resina]*[ml Solução/mg RNA] <sup>1/n</sup>
Valores	0,174	-451,8	-1,754	0,996	0,966	19,619

#### 4.4 Eletroforese do lisado neutralizado e do RNA purificado

O teste de eletroforese em matriz de agarose a 0,8% foi feito analisando-se duas soluções distintas: O lisado celular clarificado (solução A) e a solução de RNA concentrada que foi utilizada nos testes com a resina fenólica (solução B). Em ambas as soluções, esperava-se obter bandas claras de RNA, presente em

grandes quantidades nos dois casos. A Figura 14 ilustra os resultados do gel obtidos.

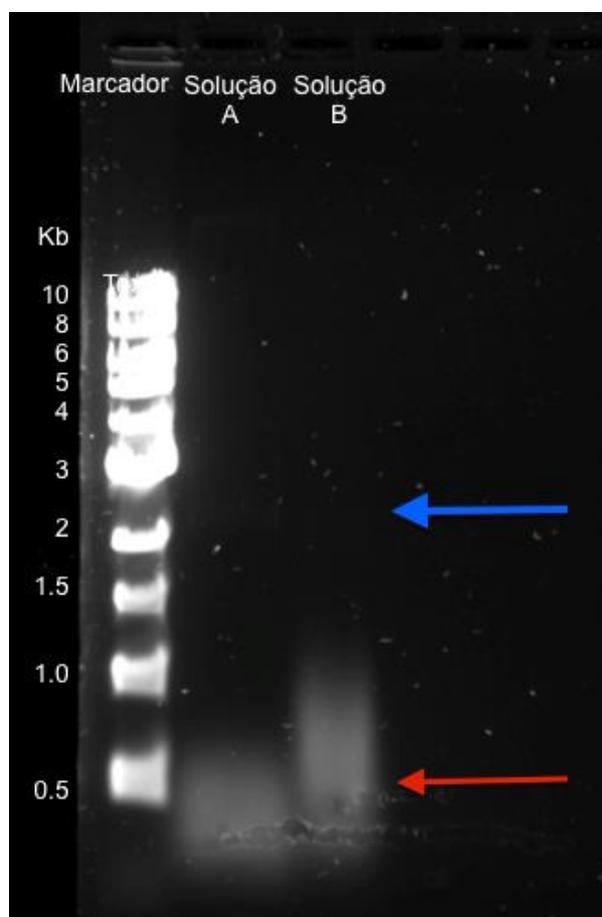


Figura 15: Eletroforese feita em matriz de agarose a 0,8%

A banda da esquerda é o marcador utilizado para indicar o tamanho das bandas obtidas para as soluções A e B. Pode-se notar bandas de alta intensidade na parte inferior do gel que corresponde ao RNA nas soluções. Por outro lado, com intensidade mais fraca, pode-se notas bandas na faixa de 2500 bp, que provavelmente corresponde ao plasmídeo pVAX1GFP. Ainda que, como indicado pela Figura 7, esse plasmídeo possua pouco mais de 3500 pb, o resultado do gel provavelmente corresponde à sua isoforma superenovelada, que por ser mais compacta, caminha mais rapidamente pela matriz de agarose do gel e, dessa forma, o marcador indica um tamanho menor da biomolécula. A baixa intensidade dessa banda reflete sua baixa concentração em ambas as soluções, o que pode ser atribuído, sob uma ótica generalizada, em sua já esperada baixa quantidade produzida em comparação com o RNA (no cultivo celular) e, por um lado mais

particular, ao cultivo celular em si, que mostrou uma fase *lag* relativamente longa e não permitiu que as células de *E.coli* pudessem produzir, em quantidades apreciáveis, o plasmídeo em questão.

## **5 CONCLUSÕES**

### **5.1 Cultivo celular**

Os resultados obtidos relativos ao crescimento celular durante o cultivo permitiram observar tanto a fase *lag* como a fase exponencial. A partir desses dados, pôde-se calcular o valor da taxa de crescimento específico das células de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo pVAX1GFP. O valor obtido é compatível com o encontrado na literatura, ainda que ligeiramente abaixo.

### **5.2 Lise celular e precipitação com isopropanol**

Após o cultivo, a lise celular permitiu recuperar de forma adequada o material intracelular, como proteínas, endotoxinas, gDNA, RNA e pDNA.

A precipitação com isopropanol a 25% permitiu, de forma seletiva, concentrar o RNA presente no lisado, cujo pellet foi resuspenso em tampão Tris-HCl 10mm e pH 8,0.

### **5.3 Testes de adsorção com resina fenólica**

Os testes realizados com a resina de Phenyl Sepharose mostraram, para concentrações de RNA iniciais superiores a 100 mg/mL, altas quantidades adsorvidas, chegando a valores próximos de 40 mg de RNA adsorvido/mL de resina. Esses valores são próximos dos encontrados para testes semelhantes feito com biomoléculas de proteínas, o que é um resultado muito positivo. Ainda sim, não foi possível determinar qualquer valor de capacidade máxima de adsorção da resina. Dessa forma, os resultados obtidos indicaram um comportamento de adsorção de RNA que não corresponde ao modelo de Langmuir, característico, por exemplo, do comportamento observado com proteínas. Por outro lado, justamente por não revelar um patamar de capacidade adsorptiva, a adsorção de RNA em resina para cromatografia hidrofóbica sugere que haja um mecanismo de adsorção não específico, isto é, não apenas entre as biomoléculas de RNA e o grupo hidrofóbico da resina, mas também entre as próprias moléculas de RNA.

Os dados foram melhor ajustados ao modelo de Freundlich, indicando que a adsorção de RNA em resina Phenyl Sepharose não ocorre com a formação de camada única de adsorbato.

## 6 PERSPECTIVAS

Uma vez que os testes de adsorção com a resina para cromatografia por interação hidrofóbica foram feitos com soluções de RNA com concentrações iniciais de até 400 mg/mL, não foi possível observar o comportamento do equilíbrio da adsorção em concentrações maiores, nos quais, por exemplo, poderia se estudar a existência de uma capacidade máxima de adsorção da resina, bem como modelos de equilíbrio de adsorção alternativos que o sistema poderia se ajustar.

Além disso, outros testes poderiam ser feitos utilizando, por exemplo, sais cosmotrópicos como o citrato de sódio, que já se mostrou eficiente em promover a interação hidrofóbica de material genético em resinas fenílicas (FREITAS; SANTOS; PRAZERES, 2009) e não possui as limitações de descarte ambiental como o sulfato de amônio, que foi utilizado nos experimentos deste trabalho.

Por fim, seria interessante também promover a adsorção entre, por exemplo, pDNA e a resina utilizada, já que existem processos cromatográficos de purificação de pDNA que se dão de maneira positiva, isto é, nos quais é o produto desejado que adsorve na matriz estacionária. Portanto, estudar o comportamento do equilíbrio de pDNA na resina poderia elucidar a capacidade adsortiva desses processos em termos de eficiência de processo.

## 7 BIBLIOGRAFIA

ALVES, C. M.; REIS, R. L.; HUNT, J. A. The competitive adsorption of human proteins onto natural-based biomaterials. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, p. 1367-1377, 2010.

AZZONI, A. R.; RIBEIRO, S. C.; MONTEIRO, G. A.; PRAZERES, D. M. F. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. **The Journal of Gene Medicine**, v. 9, p. 392-402, 2007.

BAJPAI, A. K. Blood protein adsorption onto macroporous semi-interpenetrating polymer networks (IPNs) of poly(ethyleneglycol) (PEG) and poly(2-hydroxyethylmethacrylate) (PHEMA) and assessment of *in vitro* blood compatibility. **Polymer International**, v. 56, p. 231-244, 2007.

BACHINGER, T.; MÅRTENSSON, P.; MANDENIUS, C.-F. Estimation of biomass and specific growth rate in a recombinant *Escherichia coli* batch cultivation process using a chemical multisensor array. **Journal of Biotechnology**, v. 60. p. 55-66, 1998.

BONTURI, N. **Purificação em etapa cromatográfica única de DNA plasmidial a partir de lisado neutralizado visando a sua aplicação em estudos de terapia e vacinação gênica**. 2011. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

BONTURI, N.; RADKE, V. S. C. O.; BUENO, S. M. A.; FREITAS, S.; AZZONI, A. R.; MIRANDA, E. A. 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**, v. 919-920, p. 67-74, 2013.

BO, H.; WANG, J.; CHEN, Q.; SHEN, H.; WU, F.; SHAO, H.; HUANG, S. Using a single hydrophobic-interaction chromatography to purify pharmaceutical-grade supercoiled plasmid DNA from other isoforms. **Pharmaceutical Biology**, p. 42-48, 2013.

BROWN, T. A. **Gene Cloning & DNA Analysis: an Introduction**. Wiley-Blackwell, 6<sup>a</sup> ed., 2012. 320 p.

CARAMELO-NUNES, C.; ALMEIDA, P.; MARCOS, J. C.; TOMAZ, C. T. Aromatics ligands for plasmid deoxyribonucleic acid chromatographic analysis and purification: An overview. **Journal of Chromatography A**, v. 1327, p. 1-13, 2014.

CARNES, A. E.; WILLIAMS, J. A. Plasmid DNA Manufacturing Technology. **Recent Patents on Biotechnology**, Bentham Science Publishers, v. 1, n. 2, p. 1-16, 2007.

DE LA VEGA, J.; BRAAK B. T.; AZZONI A. R.; MONTEIRO G. A.; PRAZERES D. M. Impact of Plasmid Quality on Lipoplex-Mediated Transfection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, p. 3932-3941, 2013.

DIOGO, M. M.; QUEIROZ, J. A.; PRAZERES, D. M. F. Chromatography of plasmid DNA. **Journal of Chromatography A**, v. 1069, p. 3-22, 2005.

DIOGO, M. M.; QUEIROZ, J. A.; MONTEIRO, G. A.; MARTINS, S. A. M.; FERREIRA, G. N. M.; PRAZERES, D. M. F. Purification of a Cystic Fibrosis Plasmid Vector for Gene Therapy Using Hydrophobic Interaction Chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 576-583, 2000.

DIOGO, M. M.; RIBEIRO, S.; QUEIROZ, J. A.; MONTEIRO, G. A.; PERRIN, P.; TORDO, N.; PRAZERES, D. M. F. Scale-up of hydrophobic chromatography for the purification of a DNA vaccine against rabies. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1397-1400, 2000.

FERREIRA, G. N. M.; MONTEIRO, G. A.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. **Trends in Biotechnology (Review)**, v. 18, p. 380-388, 2000.

FREITAS, S. S.; SANTOS, J. A. L.; PRAZERES, D. M. F. Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. **Separation and Purification Technology**, v. 65, p. 95-104, 2009.

HAHN, R.; DEINHOFER, K.; MACHOLD, C.; JUNGBAUER, A. Hydrophobic interaction chromatography of proteins II. Binding capacity, recovery and mass transfer properties. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 99-114, 2003.

HOARE, M.; LEVY, M. S.; BRACEWELL, D. G.; DOIG, S. D.; KONG, S.; TITCHENER-HOOKER, N.; WARD, J. M.; DUNNILL, P. Bioprocess Engineering Issues That Would Be Faced in Producing a DNA Vaccine at up to 100 m<sup>3</sup> Fermentation Scale for an Influenza Pandemic. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1577-1592, 2005.

IBRAHEEM, D.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Gene Therapy and DNA Delivery Systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 459, n. 1-2, p. 70-83, 2014.

LIMA, J. B. M.; **Efeito do Grau de Superenrolamento de Plasmídeos na sua Estabilidade Estrutural e Função Biológica**. 2008. 30 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) - Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**, Artmed, 12<sup>a</sup> ed., 1128 p.

MCCUE, J. T. Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 405-414, 2009.

PRATHER, K. J.; SAGAR, S.; MURPHY, J.; CHARTRAIN, M. Review: Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production and purification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 865-883, 2003.

PRAZERES, D. M. F.; FERREIRA, G. N. M.; MONTEIRO, G. A.; COONEY, C. L.; CABRAL, J. M. S. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. **Trends in Biotechnology (Review)**, v. 17, p. 169-174, 1999.

RAIADO-PEREIRA, L.; DE LA VEGA, J.; PRAZERES, M. F.; MATEUS, M. Development of a phenyl membrane chromatography-based process yielding pharmaceutical grade plasmid deoxyribonucleic acid for mammalian cells transfection. **Journal of Chromatography A**, v. 1337, p. 67-74, 2014.

SANHUEZA, J. T. **Problemas Ambientales con Soluciones Catalíticas**: I. El cromo en el curtido de pieles. Cap 5. Madrid, Espanha: CYTED, 2001. 185 p.

SCHMOEGER, E.; PARIL, C.; TSCHELIESSNIG, R.; JUNGBAUER, A. Adsorption of plasmid DNA on ceramic hydroxyapatite chromatographic materials. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 3125-3136, 2010.

STADLER, J.; LEMMENS, R.; NYHAMMAR, T. Plasmid DNA purification. *The Journal of Gene Medicine*, v.6, p. 54-66, 2004.

TRINDADE, I. P.; DIOGO, M. M.; PRAZERES, D. M. F.; MARCOS, J. C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, p. 176-184, 2005.

U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry**: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications, 2007, 13 p.

VILLADSEN, J.; NIELSEN, J.; LIDÉN, G. **Bioreaction Engineering Principles**. Springer, 3<sup>a</sup> ed., 2011. 561 p.

WATANABE, M.; NASU, Y.; KUMON, H. Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy: Development of an autologous cancer vaccination therapy (Review). *Oncology Letters*, v. 7, p. 595-601, 2014.

WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S. History of Gene Therapy. **Gene**, v. 525, n. 2, p. 162-169, 2013.