



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências

Estudo das condições de purificação de DNA plasmídico na sua atividade biológica em terapia do cancro

Gilson Martins de Azevedo Junior

Tese para obtenção do Grau de Doutor em
Bioquímica
(3º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor João António de Sampaio Rodrigues Queiroz
Co-orientador: Prof. Doutora Fani Pereira de Sousa

Covilhã, julho de 2019

Dedicatória

À

Toda força, inspiração e luz que recebi em todos os momentos difíceis...

A minha família por estarem ao meu lado.

“O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

Agradecimentos

Agradecimento primeiramente a Deus e as forças divinas que me mantiveram firme durante todos os momentos, especialmente nos horas de fraqueza;

Aos meus supervisores Professor Doutor João Queiroz e Professora Doutora Fani Sousa, pela valiosa contribuição para minha formação académica e pela oportunidade que recebi em participar desse projeto;

A todo apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (203482/2014-0);

Muito obrigado, Prof.^a Dr.^a Ângela Souza, Joana Valente, Margarida Almeida, Dr.^a Patrícia Pereira, Dr. Augusto Pedro, pelas conversas sobre metodologias específicas desse trabalho e que foram úteis para a conclusão dessa tese;

Agradeço ao meu amigo Tiago Santos pelos ensinamentos acerca do software Origin, que foi fundamental para organização dos cromatogramas dessa tese;

As técnicas do laboratório Margarida Carrilho e Sofia Duarte agradeço pela paciência e por garantirem a qualidade do uso de vários materiais usados durante todo esse trabalho;

A dona Maria José que também me recebeu de braços abertos, pelas palavras amigas e que por vezes me dava até feijão, para matar as saudades de minha terra;

Muitas vezes, a saudade cortou meu coração pela distância geográfica dos meus familiares, mas a presença em meu coração, me manteve firme para seguir o caminho que escolhi:

Aos meus pais, Gilson e Maria Elzir, agradeço pelos valiosos exemplos de vida que me ensinaram os reais valores e virtudes da vida, bem como o apoio incondicional que recebo;

Meus irmãos Juliano e Ana, pelo carinho;

A minha amada Pollyana, que esta sempre ao meu lado nos momentos felizes e também nos momentos turbulentos, me fortalecendo a cada dia;

Aos meus filhos, que são a inspiração do meu viver;

Eternas saudades da minha querida Avó Nelzi (*in memoriam*), que enquanto em vida, nos ensinou os conceitos de coragem e determinação, sempre com um sorriso estampado no rosto. Sinto por não ter esperado o meu regresso, mas agradeço por de alguma forma, me ajudar a prosseguir!

Artigo que resulta dessa tese

I. Azevedo G.M., Valente J.F.A., Sousa A., Pedro A.Q., Pereira P., Sousa F., Queiroz J.A.,
“Effect of chromatographic conditions on supercoiled plasmid DNA stability and bioactivity”
(Submetido)

Artigo não incluído nessa tese

I. Valente J.F.A., Sousa A., Azevedo G.M., Queiroz J.A., Sousa F. “Macroporosity in affinity chromatography: supercoiled p53 encoding plasmid isolation” (Submetido)

Comunicação científica em congresso:

I. Valente J.F.A., Pinto J.M., Azevedo G.M., Pina A.S., Queiroz J.A., Roque A.C.A., Sousa F. “A library of amino acids to screen adsorbents suitable for sc p53 encoding plasmid isolation”
II International Congress in Health Sciences Research: Towards Innovation and entrepreneurship (2017) Covilhã, Portugal

Apresentação de poster:

I. Azevedo G.M., Valente J.F.A., Sousa A., Pedro A.Q., Pereira P., Queiroz J.A., Sousa F.
“Effect of the purification conditions on the p53-pDNA stability and biological activity”
XII ANNUAL CICS-UBI SYMPOSIUM (2017) Covilhã, Portugal

Resumo

Existem mais de 200 tipos de cancro descritos e em mais de 50% dos casos, o gene supressor de tumor TP53 encontra-se mutado. Esta condição promove diferentes alterações aos mecanismos fisiológicos, passando a célula a adquirir auto-suficiência em sinais de crescimento; insensibilidade a sinais de anticrescimento; angiogénese sustentada; capacidade de invasão de tecido e metástase; potencial replicativo ilimitado e evasão de morte celular programada (apoptose). Numa situação normal, a proteína p53 protege as células contra a tumorigénese detetando stresse metabólico ou danos no DNA, e o seu mecanismo de resposta é dependente do tipo de célula e da lesão que está presente. Em resposta ao stresse, a p53 pode levar a célula à senescência, autofagia, paragem do ciclo celular, reparação do DNA e apoptose. Dessa forma, é razoável supor que o reestabelecimento da função da p53 possa controlar a proliferação do cancro. O presente trabalho pretende descrever o efeito que as condições usadas na purificação do pDNA, podem ter na sua estabilidade e atividade. Assim, é apresentada a aplicação de três colunas cromatográficas para purificar a isoforma superenrolada de pcDNA3-FLAG-p53, um plasmídeo terapêutico. A estabilidade e a atividade biológica do plasmídeo foram posteriormente avaliadas por dicroísmo circular, potencial zeta, expressão de proteína e apoptose pelo teste ELISA. Os resultados apresentados mostram que a topologia B do DNA foi mantida nas três amostras purificadas por cromatografia de afinidade e que a maior bioatividade foi verificada para o pDNA purificado através da matriz de arginina macroporosa, seguido por monólito de histidina e histidina agarose. Apesar do grau de pureza de 92% e rendimento de recuperação de 43% do sc pDNA isolado por arginina macroporosa, esta amostra permitiu a obtenção de maiores níveis de expressão da proteína terapêutica e consequentemente maior efeito apoptótico que as outras amostras de pDNA purificado por histidina agarose (grau de pureza de 97% e recuperação de 42%) e monólito de histidina (grau de pureza de 100% e rendimento de recuperação de 72%). Esse comportamento pode estar relacionado com as condições cromatográficas usadas na matriz de arginina macroporosa, nomeadamente a baixa força iónica de NaCl, em tampão de pH neutro e baixas temperaturas, quando comparadas às condições de elevada força iónica, usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e temperatura ambiente ou pH ácido, aquando da purificação do pDNA com matrizes de histidina.

Palavras-chave

Cromatografia de afinidade, força iónica, plasmídeo codificador de p53, pH, bioatividade de pDNA superenrolado, temperatura.

Abstract

There are more than 200 types of cancer described and in more than 50% of cases, the tumour suppressor gene TP53 is damaged, leading the cell to different alterations on physiological mechanisms, gaining self-sufficiency in growth signals; insensitivity to antigrowth signals; sustained angiogenesis; ability for tissue invasion and metastasis; limitless replicative potential and evasion of programmed cell death (apoptosis). In normal situations, the protein p53 protects the cells against tumorigenesis detecting metabolic stress or DNA damage, and its response mechanism is dependent on the kind of cell and injury caused. In response to stress, p53 could lead the cell to senescence, autophagy, cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis. In this way, it is reasonable to assume that the reestablishment of p53 function, may restrain the proliferation of cancer. The present work describes the effect of the chromatographic conditions used for pDNA purification on the stability and bioactivity of pDNA. Thus, three chromatographic columns were used to purify the supercoiled isoform of pcDNA3-FLAG-p53, a therapeutic plasmid. The stability and biological activity were evaluated by circular dichroism, zeta potential, expression of protein and apoptosis by ELISA assay. The results showed that the B-DNA topology was maintained for the three pDNA samples purified by affinity chromatography, but the bioactivity was better when using a pDNA purified through arginine macroporous, followed by histidine monolith and histidine agarose. Despite of the purity degree of 92% and recovery yield of 43% of the sc pDNA isolated by arginine macroporous, this sample was able to induce a higher p53 protein expression level and consequently a higher apoptotic effect, than other samples obtained by histidine agarose (purity degree of 97% and recovery of 42%) and histidine monolith (purity degree of 100% and recovery yield of 72%). This behavior can be related with the chromatographic conditions used in arginine macroporous, namely the low ionic strength of NaCl, at neutral pH and lower temperatures, when compared to the high ionic strength of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and room temperature or acidic pH used in histidine-based columns.

Keywords

Affinity chromatography, ionic strength, p53 encoding plasmid, pH, supercoiled pDNA bioactivity, temperature.

Visão Global da Tese

Esta tese está estruturada em 5 capítulos:

No Capítulo 1 é apresentado um breve enquadramento dos trabalhos e avanços realizados no âmbito da utilização do DNA como Biofármaco. Adicionalmente, está incluída uma revisão de literatura sobre a terapia génica enfatizando a sua aplicação na terapia do cancro, uma vez que é o foco de aplicação abordado neste trabalho. Nesta revisão bibliográfica, é ainda apresentada a abordagem biotecnológica que está na base da preparação de DNA plasmídico com potencial aplicação em terapia génica.

O Capítulo 2 refere-se ao objetivo global do presente trabalho, sendo igualmente detalhados os objetivos mais específicos, onde estão definidas as etapas executadas ao longo dessa tese.

O Capítulo 3 relaciona os materiais usados em cada etapa desse trabalho, bem como descreve a metodologia experimental usada para atingir os objetivos.

No Capítulo 4 estão sumarizados os resultados alcançados no âmbito deste projeto, que estão organizados de acordo com as temáticas e etapas do processo para obtenção do pDNA. Após a abordagem dos principais resultados obtidos na etapa de produção, estão incluídos os resultados da purificação de pDNA, usando três abordagens distintas. Posteriormente são incluídos os resultados de caracterização da estabilidade estrutural bem como da avaliação da bioatividade do pDNA obtido através de cada processo de purificação, com vista à discussão integrada sobre o efeito das condições de purificação sobre a estabilidade e atividade do pDNA.

O Capítulo 5, relata as principais conclusões observadas, seguido das perspetivas futuras que sugerem algumas ideias que podem vir a ser trabalhadas seguindo essa mesma linha de investigação.

No final (em Anexo) está incluída a versão do artigo que resulta deste trabalho e que se encontra submetido para publicação.

Índice

Lista de Figuras.....	xvii
Lista de tabelas.....	xix
Lista de abreviaturas.....	xxi
Capítulo 1- Introdução.....	3
1.1 Terapia Génica	3
1.2 Vetores Terapêuticos.....	6
1.2.1 Vetores Virais.....	7
1.2.2 Vetores não Virais.....	8
1.3 Métodos e Sistemas de Entrega de material genético.....	9
1.4 Terapia Génica no Tratamento de Cancro.....	12
1.4.1 Cancro e Base Genética.....	17
1.4.2 Relevância da proteína p53.....	17
1.5 Processo Biotecnológico para obtenção de pDNA.....	19
1.5.1 Biossíntese e recuperação de DNA plasmídico.....	20
1.5.2 Cromatografia de Afinidade para a purificação de pDNA.....	23
1.6 Condições que Influenciam a estabilidade e atividade do pDNA.....	29
Capítulo 2 - Objetivos.....	33
2.1 Gerais.....	33
2.2 Específicos.....	33
Capítulo 3 - Material e métodos.....	37
3.1 Biossíntese p53-pDNA.....	37
3.1.1 <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> -Estudo preliminar.....	37
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	38
3.2 Lise alcalina modificada.....	39
3.3 Purificação por Cromatografia de Afinidade.....	39
3.3.1 Histidina-Sepharose.....	39
3.3.2 Arginina-Macroporosa.....	40
3.3.3 Histidina-Monolito.....	40
3.4 Análise da pureza do pDNA purificado.....	40
3.4.1 Avaliação por cromatografia analítica.....	41
3.4.2 Quantificação de proteínas.....	41
3.4.3 Quantificação de DNA genómico.....	41
3.4.4 Quantificação de Endotoxinas.....	42
3.5 Análise Estrutural pDNA.....	42
3.5.1 Dicroísmo Circular.....	42
3.5.2 Potencial Zeta.....	43
3.6 Avaliação da Bioatividade.....	43

3.6.1 Cultura celular e transfeção.....	43
3.6.2 Citotoxicidade.....	43
3.6.3 Avaliação da expressão da proteína p53 por ELISA.....	44
3.6.4 Avaliação da Apoptose.....	44
3.6.5 Análises estatísticas.....	44
Capítulo 4 - Resultados e Discussão.....	47
4.1 Biossíntese e recuperação do plasmídeo pc flag p53.....	47
4.1.1 <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> -Estudos preliminares.....	47
4.1.2 <i>Escherichia coli</i>	50
4.2 Cromatografia de afinidade para purificação de p53-pDNA.....	51
4.2.1 Purificação de p53-pDNA por cromatografia com Histidina-Sepharose.....	52
4.2.2 Purificação de p53-pDNA por cromatografia com Arginina-Macroporosa.....	55
4.2.3 Purificação de p53-pDNA por cromatografia com Histidina-Monolito.....	59
4.3 Impacto das condições de purificação na estrutura e atividade biológica do pDNA-p53	61
4.3.1 Influência das condições cromatográficas no pDNA-p53.....	61
4.3.1.1 Análise da topologia pDNA por dicroísmo circular.....	64
4.3.1.2 Análise potencial zeta.....	66
4.3.1.3 Ensaios citotoxicidade.....	68
4.3.1.4 Análise da expressão da proteína p53.....	70
4.3.1.5 Avaliação da Apoptose mediada pela expressão da p53.....	72
Capítulo 5 - Conclusão e Perspetivas Futuras.....	77
Capítulo 6 - Referências Bibliográficas.....	83
Anexo I - “Effect of chromatographic conditions on supercoiled plasmid DNA stability and bioactivity”	95

Lista de Figuras

Figura 1: A representação mostra a abordagem “ <i>ex vivo</i> ” (lado esquerdo), onde as células do doente são removidas, geralmente por biópsia, para serem cultivadas em meio de crescimento e inoculadas com os vetores que transportam o gene terapêutico. Em seguida, as células modificadas são selecionadas e reinjetadas no doente. Na abordagem “ <i>in vivo</i> ” (lado direito), os vetores com o gene terapêutico são diretamente injetados no organismo do doente.....	4
Figura 2: Dados comparativos sobre o número de estudos em terapia génica entre 1989 e 2018.....	6
Figura 3: Representação dos principais vetores usados em terapia génica.....	7
Figura 4: Representação esquemática do transporte celular do complexo lipofectamina pDNA.....	12
Figura 5: Os cinco principais tipos de cancro responsáveis por maior número de mortes no mundo em 2018.....	16
Figura 6: Os principais tipos de cancro que mais mataram em Portugal em 2018.....	16
Figura 7: Mapa do plasmídeo construído pelo Dr. Thomas Roberts [1], usado no presente trabalho (Addgene, Cambridge, MA, USA - plasmídeo 10838), com identificação das seguintes regiões: Local de múltipla clonagem; Promotores; gene marcador de seleção. Imagem retirada (http://www.addgene.org/10838/)	20
Figura 8: Principais constituintes do lisado bacteriano.....	22
Figura 9: Principais tipos de cromatografia líquida usados na purificação de pDNA, suas vantagens e desvantagens.....	25
Figura 10: Diagrama esquemático detalhando as etapas específicas do trabalho.....	33
Figura 11: Detalhes dos ensaios preliminares para transformar <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> . Gel de eletroforese à esquerda, mostrando duas bandas do pDNA-p53 extraídos do miniprep para uso na transformação. Três diferentes massas do plasmídeo foram usadas para três tubos de células termocompetentes de <i>R. sulfidophilum</i> . As placas de petri, representam o meio sólido com três diferentes antibióticos (amp.; neo.; can) e as respetivas concentrações usadas para o crescimento da bactéria.....	38
Figura 12: A) Placa com colónias de <i>Rhodovulum sulfidophilum</i> após 5 dias de incubação em meio sólido com ampicilina (250 µg/mL). B) Crescimento em meio líquido contendo ampicilina (250 µg/mL), após a recuperação da massa celular por centrifugação.....	48
Figura 13: Gel de eletroforese 0,8% mostrando possíveis bandas de DNA extraídas de <i>R. sulfidophilum</i> . A) extração do DNA, por miniprep e do meio extracelular, precipitado com isopropanol e B) clivagem por enzima APAI da banda precipitada do meio líquido de <i>R. sulfidophilum</i>	49
Figura 14: Esquema que representa o processo desde a biossíntese, recuperação celular, lise alcalina e o gel de agarose 0,8%, mostrando o pDNA extraído.....	50
Figura 15: Cromatograma representativo apenas das corridas com tampão (Branco).....	52
Figura 16: Perfil cromatográfico e análise em gel de agarose de amostras purificadas do lisado clarificado, através da matriz histidina-sepharose.....	53

Figura 17: Cromatograma referente a análise quantitativa da amostra purificada através da coluna histidina-sepharose-: (A) Lisado clarificado; (B) Fração referente a isoforma sc pDNA.....	54
Figura 18: Estrutura química da arginina-macroporosa.....	55
Figura 19: Perfil cromatográfico e análise em gel de agarose de amostras purificadas do lisado clarificado, através da matriz arginina-macroporosa.....	56
Figura 20: Cromatograma referente a análise quantitativa da amostra purificada através da coluna arginina-macroporosa.....	58
Figura 21: Perfil cromatográfico e análise em gel de agarose de amostras purificadas do lisado clarificado, através da matriz histidina-monolito.....	59
Figura 22: Cromatograma referente a análise quantitativa da amostra purificada através da coluna histidina-monolito.....	60
Figura 23: Análise da estrutura do pDNA por dicroísmo circular. (A) Amostras em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0. (B) Amostras em tampão Citrato de Sódio 10mM + EDTA 10mM pH 5,0.....	65
Figura 24: Análise do potencial zeta das moléculas de pDNA purificado através das colunas: Histidina-sepharose; Arginina-macroporosa e Histidina-monolito, nos respetivos tampões de eluição. O potencial zeta de amostras de pDNA nativo também é mostrado.....	67
Figura 25: Análise de viabilidade celular após a transfeção com complexo Lipofectamina 2000-pDNA-p53 em linhas celulares de HeLa e hFib, após 48 horas de transfeção.....	69
Figura 26: Teste de ELISA, mostrando a taxa de expressão da proteína p53 após 48 horas de transfeção com os complexos lipofectamina-sc p53-pDNA, em células do carcinoma cervical (HeLa). Células não transfetadas foram usadas como controlo. As informações são representadas com uma média \pm erro padrão (S.D.).....	70
Figura 27: Apoptose mediada pela p53 em células do cancro cervical HeLa após tratamento com plasmídeo terapêutico.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparações entre algumas características dos principais vetores usados em terapia génica.....	9
Tabela 2: Veículos de entrega utilizados.....	10
Tabela 3: Produtos de terapia génica já comercializados	13
Tabela 4: Ensaios clínicos em fase III ou IV, para tratamento de cancro.....	14
Tabela 5: Ensaios clínicos em fases I/II para tratamento do cancro, recorrendo aos plasmídeos como sistemas de entrega do transgene.....	15
Tabela 6: Características físico-químicas dos diferentes constituintes do lisado.....	23
Tabela 7: Limites estabelecidos pelas agências reguladoras para produtos terapêuticos.....	24
Tabela 8: Quantificação das impurezas associadas ao sc pDNA purificado por histidina-sepharose, comparados aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras	54
Tabela 9: Quantificação das impurezas associadas ao sc pDNA purificado por arginina macroporosa, comparados aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras.....	58
Tabela 10: Quantificação das impurezas associadas ao sc pDNA purificado por histidina-monolito, comparados aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras	61
Tabela 11: Características gerais dos suportes cromatográficos em estudo e principais condições experimentais.....	62

Lista de abreviaturas

ABS	Absorbância
AGE	Eletroforese em gel de agarose
AMP	Ampicilina
Can	Canamicina
DNA	Acido desoxirribonucleico
D.O	Densidade óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMA	“European Medicines Agency”
FDA	“Food and Drug Administration”
gDNA	DNA genómico
LAL	Lisado de amebócito de <i>Limulus</i>
ln pDNA	DNA plasmídico linear
Neo	Neomicina
nm	Nanómetro
oc pDNA	DNA plasmídico circular aberto
pDNA	DNA plasmídico
<i>R. sulfidophilum</i>	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>
RNA	Acido ribonucleico
sc pDNA	DNA plasmídico superenrolado
Vol	Volume

Capítulo 1

1. Introdução

Os avanços na biologia molecular, particularmente desde a descoberta do gene como elemento com função na hereditariedade, por Gregor Mendel no século XIX, até à descodificação do genoma humano, passando pela elucidação da existência e função das enzimas de restrição, em muito contribuíram para a evolução de técnicas revolucionárias como a tecnologia do DNA recombinante, que permitem a manipulação, clonagem e expressão de genes em diferentes células [2]. Com a possibilidade de manipular o ácido desoxirribonucleico (DNA), a área da genética molecular ganha impacto, fornecendo também potencial para a correção de genes alterados, ou até mesmo adição de genes em falta diretamente no genoma, sendo assim um importante pilar para a terapia génica [3]. A investigação no âmbito deste tipo de terapias inovadoras ganhou atenção desde então, inicialmente visando a cura de doenças monogénicas, mas com a sequenciação do genoma humano [4, 5] várias abordagens mais ambiciosas passaram a ser alvo de estudo, visando o tratamento de doenças multifatoriais e hereditárias [6]. Assim sendo, é importante salientar que um gene exógeno inserido e expresso em outra célula, fica então definido como um transgene, que geralmente é o alvo para terapia génica.

1.1 Terapia Génica

A Terapia Génica é uma abordagem terapêutica que consiste na substituição de genes mutados por genes funcionais, bem como a inserção de genes ausentes em uma determinada célula, com a finalidade de produção de uma proteína funcional para a manutenção da viabilidade celular, evitando ou tratando a doença [7]. De facto, ao contrário das estratégias terapêuticas inovadoras que se pretende que atuem na causa da doença, as estratégias convencionais têm-se focado essencialmente com controlo das consequências provocadas pela patologia [8]. A abordagem de terapia génica, teoricamente poderia ser executada em células germinativas, mas atualmente as aplicações são somente em células somáticas, uma vez que a inserção de genes nesta linhagem celular, seguida da expressão transiente no núcleo da célula, é considerado mais segura pelas agências reguladoras, como *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA) [9]. Ao contrário, a abordagem em linhas germinativas, teoricamente, poderia ser vantajosa considerando o facto de que o transgene poderia ser transferido para as células descendentes, mas na prática, não se conhecem quais poderiam ser as consequências reais desse tipo de tratamento. Quanto aos protocolos terapêuticos de transferência génica, esses podem incidir em duas vertentes (figura 1): usando a abordagem “*ex vivo*” onde células do doente são removidas, geralmente por biópsia, para em seguida serem incubadas com o transgene, normalmente associado a um vetor, e serem posteriormente reinjetadas no organismo do indivíduo em tratamento. Esta abordagem pode representar uma mais valia pelo facto de permitir a seleção de células com as alterações genéticas alvo, antes da aplicação no doente [10]. Por outro lado, a abordagem “*in vivo*” recorre à inserção do

transgene diretamente no organismo do doente [11], sendo que esta abordagem pode ser útil caso o tecido alvo não seja de fácil acesso [12]

Terapia Génica

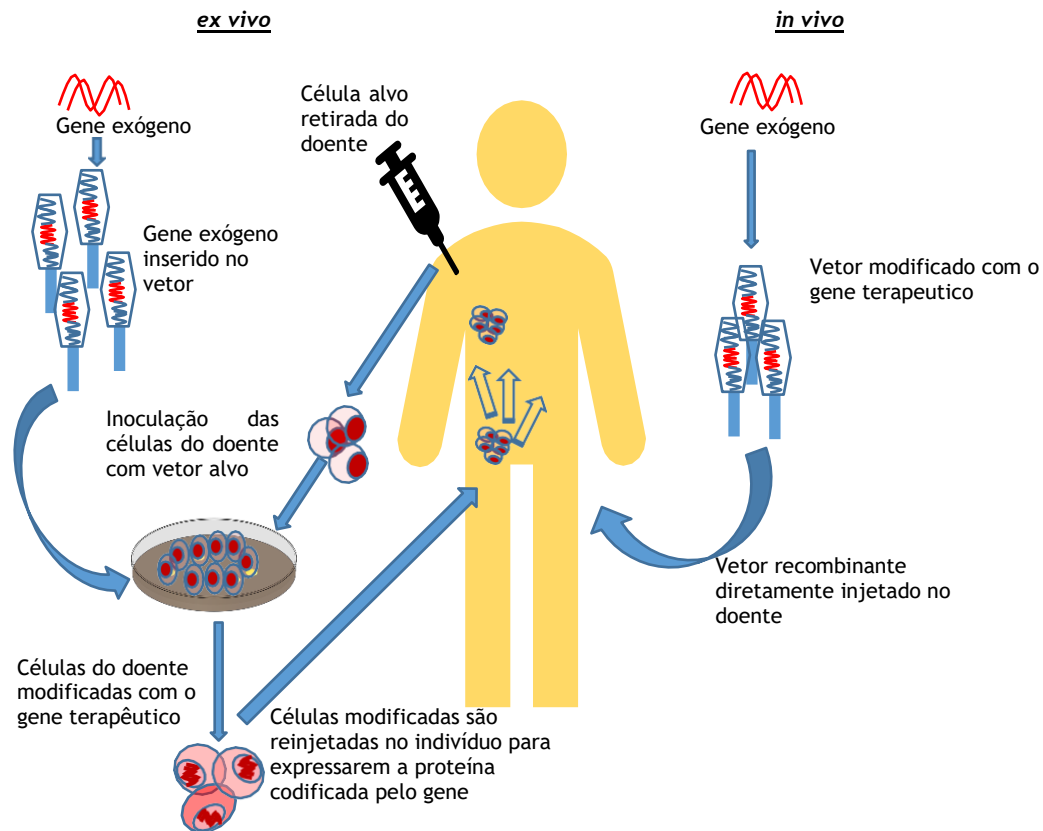


Figura 1: A representação mostra a abordagem “*ex vivo*” (lado esquerdo), onde as células do doente são removidas, geralmente por biópsia, para serem cultivadas em meio de crescimento e inoculadas com os vetores que transportam o gene terapêutico. Em seguida, as células modificadas são selecionadas e reinjetadas no doente. Na abordagem “*in vivo*” (lado direito), os vetores com o gene terapêutico são diretamente injetados no organismo do doente. (Adaptado de Kaji and Leiden (2001)) [13]

O protocolo “*ex vivo*”, foi usado no primeiro tratamento por terapia gênica em humanos na década de 90, onde a reposição gênica foi feita em células T retiradas de duas crianças afetadas por uma disfunção genética conhecida como deficiência de adenosina desaminase (ADA) [14]. Os portadores de ADA sofrem de uma severa desordem do sistema imunitário, devido à ausência da enzima adenosina desaminase que é responsável pela manutenção dos linfócitos T e como consequência estão expostos a diferentes agentes infecciosos, que podem causar a morte dos portadores desta doença monogênica [15]. Após a incubação das células T com o vetor retroviral contendo o gene recombinante que codifica para a adenosina desaminase, as células foram reinjetadas nas crianças, resultando no sucesso do tratamento, o que encorajou novos tratamentos [14]. Esse grande entusiasmo, levou também ao uso de abordagens mais ambiciosas, como o tratamento “*in vivo*”, onde o gene é administrado diretamente no organismo do doente. Num ensaio seguinte, foi feita uma tentativa de reverter a deficiência de ornitina transcarbamilase (OTC), que é uma enzima hepática responsável pela remoção do excesso de azoto de aminoácidos e proteínas [16]. Neste caso, foi feita a injeção do gene OTC, diretamente no organismo de um jovem de 18 anos, usando um adenovírus como vetor. Quatro dias após o tratamento, ocorreu a sua morte por falência múltipla dos órgãos, muito provavelmente como resultado da resposta imune ao vetor viral [17]. Outro ensaio de terapia gênica foi usado para tratar 10 crianças portadoras de imunodeficiência severa combinada ligada ao cromossomo X (SCID- X1), popularmente conhecida como síndrome do “menino bolha”. A abordagem utilizada, foi “*ex vivo*” e as células sanguíneas dos doentes foram incubadas com um vetor retroviral para entrega do gene funcional, que em seguida foram reinjetadas nas crianças, no entanto, o tratamento não foi bem sucedido e 2 crianças desenvolveram leucemia 30 meses após o tratamento, gerando dúvidas em relação aos vetores usados em terapia gênica [18]. Dessa forma, muitos dos trabalhos de terapia gênica foram perdendo força enquanto outros acabaram por ser descontinuados até que novas abordagens começaram novamente a impulsionar o campo desta abordagem terapêutica. A figura 2 mostra o progresso nesta área desde a primeira aprovação em 1989 até o ano 2018.

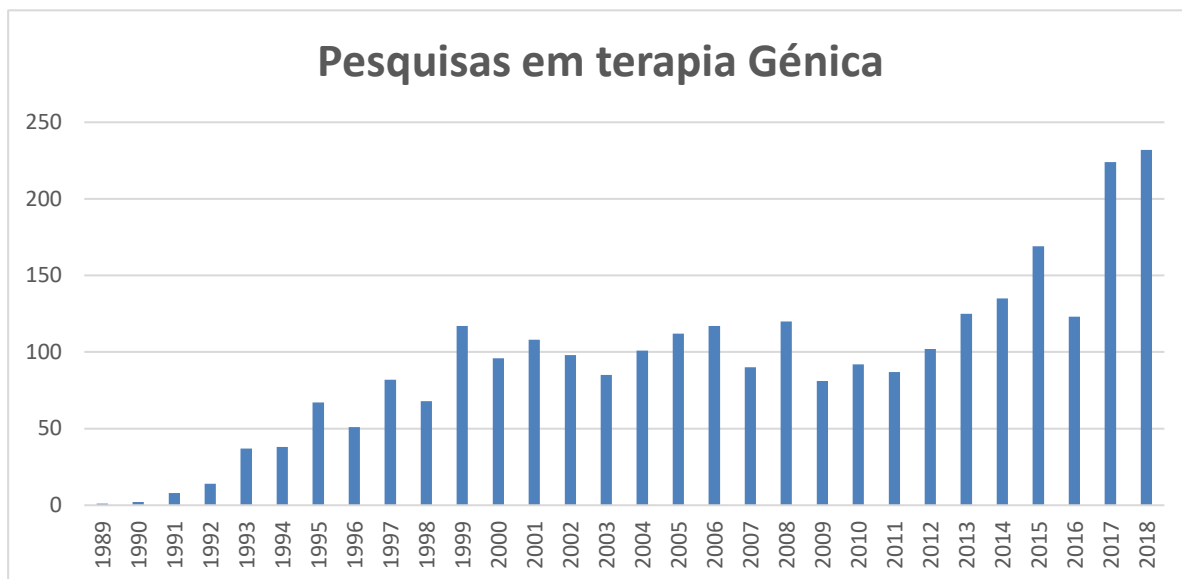


Figura 2: Dados comparativos sobre o número de estudos em terapia génica entre 1989 e 2018 (<http://www.abedia.com/wiley/years.php>)

Como referido, muitas das quedas observadas deram-se por complicações em determinados casos, por exemplo, associados aos sistemas de entrega e vetores virais usados, como foi o caso da morte de Jesse Gelsinger [17] e outras complicações, como o caso das crianças que desenvolveram leucemia após tratamento para reverter SCID-X1 [18]. Esses acontecimentos levaram a uma suspensão nos ensaios clínicos na União Europeia e Estados Unidos, com as atividades sendo apenas retomadas a partir de 2012 [19]. Entretanto a China, que não interrompeu os estudos no período de suspensão, ocupou a liderança da investigação na área da terapia génica, uma vez que o governo e a *Chinese Food and Drug Administration* (CFDA) continuaram a apoiar essas atividades [19], o que os levaria a aprovar o primeiro produto de terapia génica para uso comercial, Gendicine™, que tem como aplicação, o tratamento de cancro da cabeça e pescoço e utiliza o gene que codifica a proteína p53, e um adenovírus atenuado como veículo de entrega do gene terapêutico. A retomada dos tratamentos terapêuticos em 2012 por países membros da União Europeia e pelos Estados Unidos, foi impulsionada principalmente, pela busca de vetores capazes de garantir não somente a expressão estável do gene a nível nuclear, durante o tempo necessário para o tratamento da doença mas também mais seguros e que não provoquem efeitos adversos associados a esses vetores de entrega [20].

1.2 Vetores terapêuticos

Devido às propriedades semipermeáveis da membrana plasmática, é necessário encontrar um vetor que facilite a entrada do gene nas células eucarióticas, uma vez que a absorção do gene pela membrana eucariótica é quase nula [21]. Essa dificuldade na absorção do material genético (DNA, RNA) pela membrana, deve-se principalmente pela forte carga negativa dos ácidos nucleicos [22]. Para contornar essa dificuldade, a técnica do DNA recombinante no contexto terapêutico, tem sido o primeiro passo para a terapia génica, possibilitando a manipulação do

gene e clonagem numa molécula de DNA base, designada de vetor. Os genes terapêuticos, normalmente são clonados entre sequências nucleotídicas responsáveis pelo controlo e expressão do gene, como os promotores, *enhancers* e sequências de poliadenilação, podendo essas sequências variar, intensificando ou diminuindo, os níveis de expressão proteica [23] e até mesmo restringir a expressão a um determinado tipo de células [24]. O uso e seleção dos vetores depende dos genes e tipo de células onde os transgene serão expressos e variam quanto à eficiência de entrega do material genético, seletividade celular, toxicidade causada e capacidade de proteção do gene transportado. Atualmente, para uso em terapia génica, duas classes principais de vetores (figura 3) têm sido amplamente usadas, nomeadamente os vetores de origem viral e não viral.

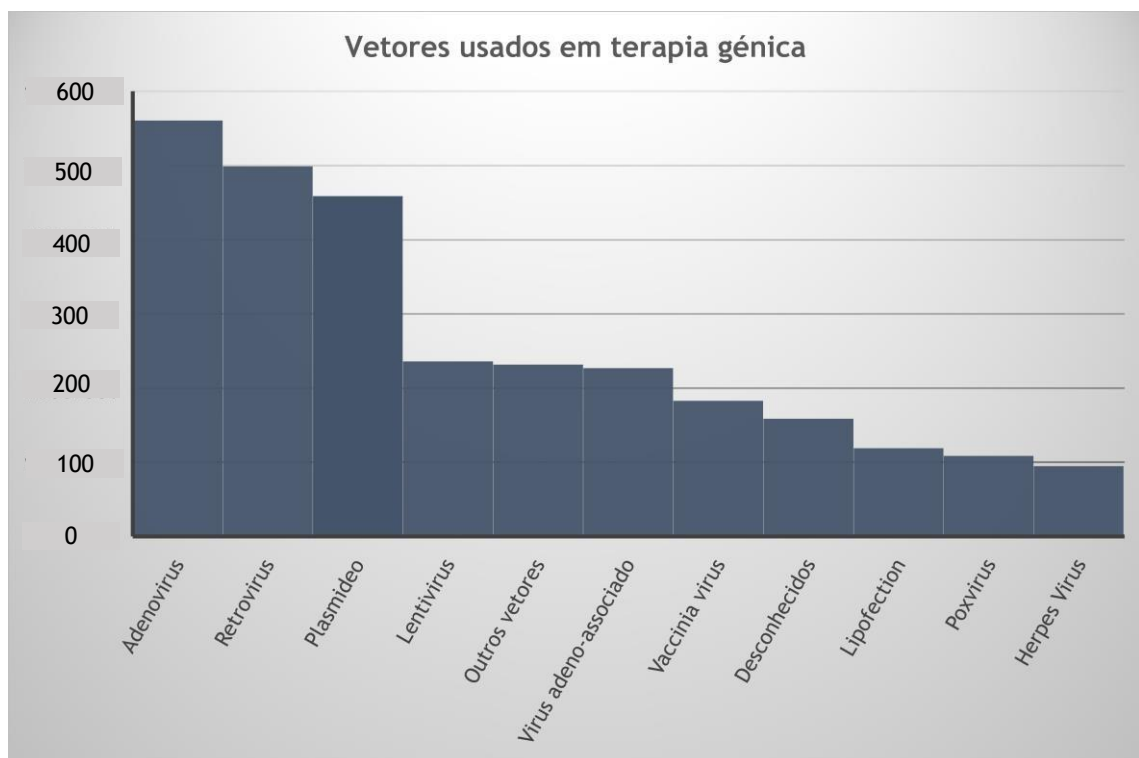


Figura 3: Representação dos principais vetores usados em terapia génica (Fonte: <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>).

1.2.1 Vetores virais

Devido à capacidade natural de infetar e transmitir o seu DNA às células, os vírus foram identificados como elementos potencialmente vantajosos para a terapia génica, considerando até o facto de poderem transmitir grandes cargas genéticas, garantindo a expressão do transgene na célula modificada e a alta especificidade celular, que permite a entrega seletiva do transgene à célula [7]. Muito embora os vetores virais para uso terapêutico tenham sua capacidade virulenta eliminada ou atenuada, o que é feito geralmente por eliminação da capacidade de replicação intracelular, esses vetores podem apresentar desvantagens pela

capacidade de causar infecções em determinados indivíduos, podendo induzir graves respostas imunogênicas e causando mesmo a morte. O que acontece é que esses vírus com a capacidade de replicação atenuada, podem ainda, adquirir os genes responsáveis por essa replicação, talvez por um processo de recombinação genética que pode acontecer durante o processo de atenuação, o que por sua vez irá restituir ou até intensificar a capacidade replicativa do vírus, como no caso dos adenovírus [25-27]. Diferentes vírus têm sido usados como vetores terapêuticos e a escolha geralmente recai no tipo de célula a ser tratada, nas características do transgene e a forma de atenuação usada para minimizar os possíveis problemas causados pelo vírus no doente (Tabela 1). Dos principais problemas que podem ser causados pelo uso dos vetores virais, a imunogenicidade e oncogenicidade são os mais reportados na literatura [28].

1.2.2 Vetores não virais

Como alternativa aos vetores virais, surgem os plasmídeos (moléculas de DNA circular) que se apresentam como sistemas mais seguros e promissores para aplicação em ensaios de Terapia Génica [29]. Desde a década de 90 que os vetores não virais, e especificamente os plasmídeos, têm atraído a atenção da comunidade científica por serem relativamente fáceis de produzir, apresentarem custos reduzidos, além de possibilitarem um melhor armazenamento e transporte do transgene [7]. As taxas de integração dos plasmídeos ou fragmentos no genoma hospedeiro são reduzidas e a molécula pode ser administrada nas células dos doentes, repetidas vezes, o que representa outra grande vantagem em relação aos vetores virais [7]. Mas apesar das vantagens dos plasmídeos sobre os vetores virais, alguns desafios ainda precisam ser contornados para maximizar e melhorar o uso do pDNA na área da terapia génica. Em grande parte, a natureza estrutural do plasmídeo traz algumas limitações à aplicação, por exemplo: quanto maior for o plasmídeo, maior deve ser o cuidado a ter durante a sua manipulação, uma vez que este será mais suscetível ao cisalhamento durante as etapas laboratoriais de produção e recuperação [30]. É importante também ressaltar que o tamanho do plasmídeo pode aumentar a taxa de recombinação intramolecular, durante a biossíntese da molécula no interior da célula hospedeira, além de aumentar também a carga metabólica da célula, podendo comprometer o rendimento final do plasmídeo [31-33]. Os plasmídeos têm a função natural de oferecer às bactérias (hospedeiras naturais) vantagens adaptativas [34, 35]. No entanto, na sua aplicação na tecnologia de DNA recombinante, mais importantes são as sequências específicas para expressão do produto e as sequências que constituem os módulos de replicação que garantem que a molécula seja replicada no hospedeiro. No entanto, a limitação de replicação num só hospedeiro pode também ser considerada uma desvantagem, já que na maioria das vezes os plasmídeos usados em vetores terapêuticos acabam por se limitar a replicações em células bacterianas que representam alguma patogenicidade humana [36]. Esses são exemplos de algumas limitações que estão a ser consideradas e contornadas com construções mais inovadoras desses vetores.

Tabela 1: Comparações entre algumas características dos principais vetores usados em terapia génica [37]

Características	Vetores virais				Vetores não virais
	Adenovirus	Adenoassociados	Retrovirus	Lentivirus	Plasmídeo
Genoma	dsDNA	ssDNA	ssRNA	ssRNA	dsDNA
Capacidade Transgene	37kb	4,9kb	8kb	8kb	Não é conhecido
Células proliferativas	Independente	Independente	sim	Independente	Independente
Integração no genoma hospedeiro	Não	Raro. Condicionado ao gene <i>Rep</i>	Sim	Sim	Raro
Expressão transgene	Transiente	Transiente	Estável	Estável	Transiente
Resposta imune	Alta	Pouca	Pouca	Pouca	Não
Problemas relacionados	Resposta inflamatória/toxicidade	Resposta inflamatória	Mutação/inserção	Mutação/inserção	Não

1.3 Métodos e Sistemas de Entrega de material genético

Um estudo feito em animais estimou que a meia vida do plasmídeo após injeção intravenosa era de apenas 10 minutos [38], devido à existência de várias endonucleases presentes no fluido extracelular [39]. No entanto, e ainda que o plasmídeo não se degradasse, também é conhecido o facto de os ácidos nucleicos, por si só não serem eficientes a atravessar a membrana celular e nuclear para promover a entrega do gene e conduzir à expressão da proteína [22], e mesmo o citoplasma oferece resistência ao plasmídeo livre, já que este espaço também está repleto de endonucleases [39]. Considerando que ambas as entregas do material genético pelas vias *in vitro* e *in vivo* são comprometidas pela existência de endonucleases, algumas medidas precisaram ser adotadas para contornar esta problemática no campo da terapia génica. Trata-se então do uso de métodos e sistemas de entrega dos ácidos nucleicos, que podem ser realizados com recurso a métodos físicos, partículas inorgânicas ou métodos químicos [40], conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2: Métodos e Sistemas de entrega utilizados

Categoria	Método/Sistema de entrega produto terapeutico	Metodologia/material	Referências
Métodos físicos	Microinjeção	Injeção na célula	[40]
	Eletroporação	Campo elétrico permeabiliza a membrana plasmática	[41]
	Biobalística (gene gun)	Bombardeamento de partícula a alta velocidade	[40]
	Entrega hidrodinâmica	Pressão hidrodinâmica por injeção rápida	[42]
	Sonoporação	Ultrassom, permeabiliza a membrana plasmática	[43,44]
	Magnofecção	Material genético em partículas magnéticas, inoculados na célula alvo por campo magnético	[40]
Métodos Químicos	Polímeros	Quitosano	[45]
		Dendrímeros	[46]
		Polimetacrilatos	[47]
	Lipídeos Cationicos	Lipossomas Catiônicos	[45]
		Emulsões Catiônicos	
	Peptídeos	Zein	[48]
		Gelatin	[49,50]
		Albumina+chitosan	[51]
		Fibroina da seda	[52]
	Nanopartículas Inorgânicas	Ouro	Superfície flexível, auxilia funcionalização DNA
Grafeno		Protege o DNA contra clivagem e permite liberação gradual do DNA funcionalizado	[53]
Quantum Dots		Eficiência na ligação com pDNA	[54]
Oxido de ferro		Eficiente na transformação fibroblastos embrionários de rato	[55]
	Fosfato de cálcio	Biocompatibilidade, biodegradável	[56]

Os métodos físicos, têm como princípio a desestabilização da membrana plasmática alterando seu estado de permeabilização para facilitar a entrega do produto terapêutico no interior celular [40]. Os sistemas baseados em nanopartículas inorgânicas, podem oferecer algumas vantagens pois não sofrem ataques microbianos, podem ser preparados facilmente, apresentam uma baixa toxicidade além de se manterem estáveis por mais tempo [57, 53]. Já as abordagens de entrega baseadas nos métodos químicos, oferecem grandes vantagens em relação aos métodos anteriormente citados pois apresentam custos relativamente reduzidos, uma biodegradabilidade desejada o que evita o acumular da partícula no interior celular, conseqüentemente evitando toxicidade desnecessária [58]. Por esses motivos, são os mais usados, mostrando-se eficientes na entrega de uma ampla diversidade de produtos terapêuticos, como agentes antimicrobianos [59], anticancerígenos [60], hormonas [61], proteínas [62], vacinas [63] e ácidos nucleicos [64, 65]. Relativamente a entrega do vetor plasmídico por métodos químicos, importa realçar o uso de lipossomas catiónicos, que apresentam algumas características importantes para diversas estratégias terapêuticas.

Os lipossomas catiónicos são formados por uma bicamada lipídica, com um ou mais átomos de azoto carregado positivamente. A carga positiva presente na superfície do lipossomo é a responsável pela interação com os ácidos nucleicos, facilitando também a interação e passagem através da membrana celular, que é maioritariamente carregada negativamente [66]. Após a entrada no citoplasma, o transgene precisa atingir o núcleo para poder ser transcrito e expresso, sendo este processo facilitado nas células em divisão, uma vez que o DNA transferido tem uma maior probabilidade de ser incluído no envelope nuclear, após a remontagem no final do ciclo mitótico [66]. Comercialmente existem diversos produtos baseados neste tipo de sistema de entrega, nomeadamente a lipofectamina, que não apresenta uma eficiência de transfeção diminuída em células pós mitóticas [67], e é amplamente reconhecido pela segurança na entrega do material genético às células. Os complexos formados, lipofectamina + pDNA, são considerados estáveis e o transporte através da membrana plasmática ocorre por endocitose [68]. Um estudo realizado em 2016 sugeriu também que o transporte intracelular dos complexos lipofectamina+DNA é maioritariamente realizado por movimentos brownianos e por esse motivo, os complexos acabam por evitar a degradação lisossomal, resultando numa melhor taxa de entrega do DNA ao núcleo, onde o gene será expresso. Alternativamente aos movimentos aleatórios brownianos, alguns sistemas de entrega utilizam preferencialmente o transporte ativo, feito ao longo dos microtúbulos, o que conduz a alguma degradação do DNA e subsequentemente uma menor taxa de entrega do material genético ao núcleo [69].

A figura 4 representa o transporte celular do complexo formado entre pDNA e lipofectamina, onde o complexo é internalizado, através da membrana, via endocitose.

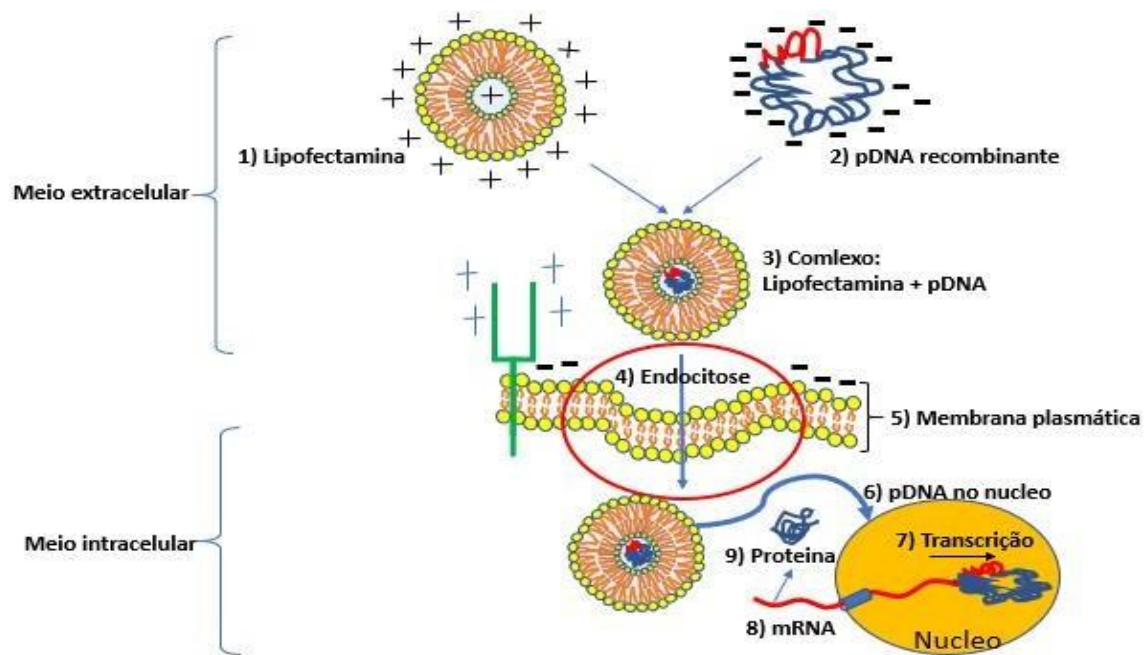


Figura 4: Representação esquemática do transporte celular do complexo lipofectamina+pDNA. Adaptado [39]

A lipofectamina, usada nesse trabalho, representa um veículo de entrega químico comercial, sendo uma alternativa ao uso dos vetores virais. Relativamente aos sistemas de entrega, o campo da terapia gênica hoje conta com as metodologias acima mencionadas e muitas vezes com o uso combinado dessas estratégias, como por exemplo, em abordagens onde partículas inorgânicas são cobertas com DNA terapêutico para em seguida serem inseridos nas células por meio de biobalística, por exemplo. Nesse caso métodos químicos e físicos são associados para um melhor resultado da estratégia terapêutica [70]. Desde a primeira abordagem, no âmbito da terapia gênica, ficou evidente também que os avanços dos sistemas de entrega e vetores terapêuticos são fundamentais para garantir o sucesso do tratamento, considerando também a complexidade de muitas doenças a serem abordadas, como é o caso do cancro que representa hoje 66% das pesquisas terapêuticas (<http://www.abedia.com/wiley/index.html>)

1.4 Terapia Gênica no Tratamento de Cancro

De facto é interessante observar os progressos no campo da terapia gênica e o impulso dado a cada novo medicamento lançado no mercado, desde o primeiro medicamento, Gendicine™, liberado pela *Chinese Food and Drug Administration* (CFDA) ainda durante o período de suspensão, conforme mencionado acima (figura 2) até o mais recente, Luxturna™, aprovado pela FDA. A tabela 3 mostra os fármacos aprovados, com aplicação em terapia gênica.

Tabela 3: Produtos de terapia génica já comercializados. Adaptado [71]

Nome Comercial	Data de Aprovação	Órgão Regulamentador	Indicação	Fabricante
Gendicine	Outubro 2003	Chinese Food and Drug Administration (SFDA)	Cancro cabeça e pescoço	Shenzhen SiBiono GeneTech (Shenzhen, China)
Oncorine H101	Novembro 2005	CFDA	Carcinoma nasofaringe	Shanghai Sunway Biotech Co
Neovasculgem	2011	Russia	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Human Stem Cells Institute
Glybera®	Novembro 2012	EMA	Deficiência de lipoproteína lipase	uniQure (Amsterdam, Netherlands)
Strimvelis™	Junho 2016	EMA	Deficiência de adenosina desaminase (ADA-SCID)	GlaxoSmithKline (Middlesex, United Kingdom)
Kymriah™ (tisagenlecleucel)	Agosto 2017	FDA	Leucemia linfoblástica aguda	Novartis Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)
Yescarta™ (axicabtagene ciloleucel)	Outubro 2017	FDA	Linfoma de células B	Kite Pharma, Incorporated (Santa Monica, California, USA)
Luxturna™ (voretigene neparvovec-rzyl)	Dezembro 2017	FDA	Distrofia da retina (mutações bialélicas RPE65)	Spark Therapeutics, Inc. (Philadelphia, Pennsylvania, USA)

No que se refere aos ensaios clínicos em curso, até ao presente, um total de 2805 ensaios clínicos com abordagem terapêutica foram concluídos, aprovados ou estão a decorrer, em todo o mundo. Desses ensaios, (obtidos na base de dados <http://www.abedia.com/wiley/>), um total de 1852 ensaios referem-se a intervenções clínicas ao cancro. Um dos maiores fatores que justificam a busca por novas formas de tratamento ao cancro são os fatores relacionados com as despesas económicas que podem ser cada vez maiores com o aumento de novos casos da doença [72]. Dos ensaios com foco na terapia de cancro, 182 têm como abordagem terapêutica a expressão de supressores de tumor e desses, 47 ensaios têm como alvo o gene p53. A tabela 4 mostra alguns ensaios já em estágio avançado (fases III e IV) e que utilizam genes supressores

de tumor. Nesses ensaios clínicos relativos a intervenções no tratamento de cancro, o método de entrega do transgene é pelo sistema viral e isso se deve ao uso alargado desses métodos, apesar dos efeitos adversos.

Tabela 4: Ensaios clínicos em fase III ou IV, para tratamento de cancro.

Categoria	Gene	Sistema Entrega	Estagio	País	Referência Ensaio
Carcinoma nasofaringe	P53	Adenovirus	Fase III	China	CN-0009
Cancro Cervical	p53	Adenovirus	Fase III	China	CN-0010
Carcinoma hepatocelular	E1B deleted	Adenovirus	Fase III	China	CN-0030
Cancro Cabeça e pescoço	p53	Adenovirus	Fase III	Alemanha	DE-0072
Células escamosas cabeça e pescoço	p53	Adenovirus	Fase III	EUA	US-0366
Cancro Cervical	HPV-E7	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fase III	EUA	US-1506
Cancro Tíróide	P53	Adenovirus	Fase IV	China	CN-0013
Cancro Tíróide	P53	Adenovirus	Fase IV	China	CN-0014

Em ensaios ainda em estágios mais iniciais (fases I e II), já é evidenciado o uso de vetores de entrega não viral, especificamente os plasmídeos (tabela 5). O uso de plasmídeos como método de entrega do transgene tem vindo a ganhar relevância, uma vez que não apresentam os riscos associados aos vetores virais. No geral, o uso de genes supressores de tumor tem sido uma abordagem promissora para o tratamento de cancro.

Tabela 5: Ensaios clínicos em fases I/II para tratamento do cancro, recorrendo aos plasmídeos como sistemas de entrega do transgene.

Categoria	Gene	Sistema Entrega	Estagio	País	Referência Ensaio
Carcinoma Células escamosas	HPV-16-E7	pDNA	Fase I	Holanda	NL-0035
Cancros avançados	Citocromo p-450	pDNA	Fase I	EUA	US-0626
Cancros Avançados	Cit-p450/CYP1B1	pDNA	Fase I	EUA	US-0742
LLC*	Bcl-2	pDNA	Fase I/II	Reino Unido	UK-0130
Cancro Cervical	(HPV)** 16 E7	pDNA	Fase I/II	EUA	US-0595
Metástase	CYT-p450/CYP1B1	pDNA	Fase I/II	EUA	US-0706
Neoplasia interepitelial	(HPV) E6/E7	pDNA	Fase II	Estónia/Ucrania	EE-0001
Neoplasia Interepitelial Cervical 3	(HPV) E6/E7	pDNA	Fase II	Coreia do Sul	KR-0016
Ano-Genital neoplasia III	(HPV) E6/E7	pDNA	Fase II	Reino Unido	UK-0071
Glioblastoma	CYT-p450/CYP1B1	pDNA	Fase II	EUA	US-0912

* Leucemia Linfocítica Crónica (LLC); ** Papiloma vírus Humano (HPV); Citocromo (CYT)

Inicialmente, a terapia génica limitava-se apenas a intervenções em doenças monogénicas e devido a alguns resultados promissores, as pesquisas no campo das terapias passaram também a abranger doenças multifatoriais e adquiridas, como no caso do cancro que representa hoje um grave problema de saúde que afeta a humanidade devastando e deixando fortes sequelas não somente naqueles que sofrem diretamente com a doença, mas também naqueles que indiretamente são atingidos. O cancro foi responsável pela morte de 9,6 milhões de pessoas em todo o mundo em 2018, sendo a segunda principal causa de morte segundo dados estatísticos (WHO, 2018 disponível em <https://www.who.int/cancer/en/>, consultado dia 24/01/2019).

A figura 5, mostra os principais tipos de cancro associados a maior número de mortes no ano de 2018.

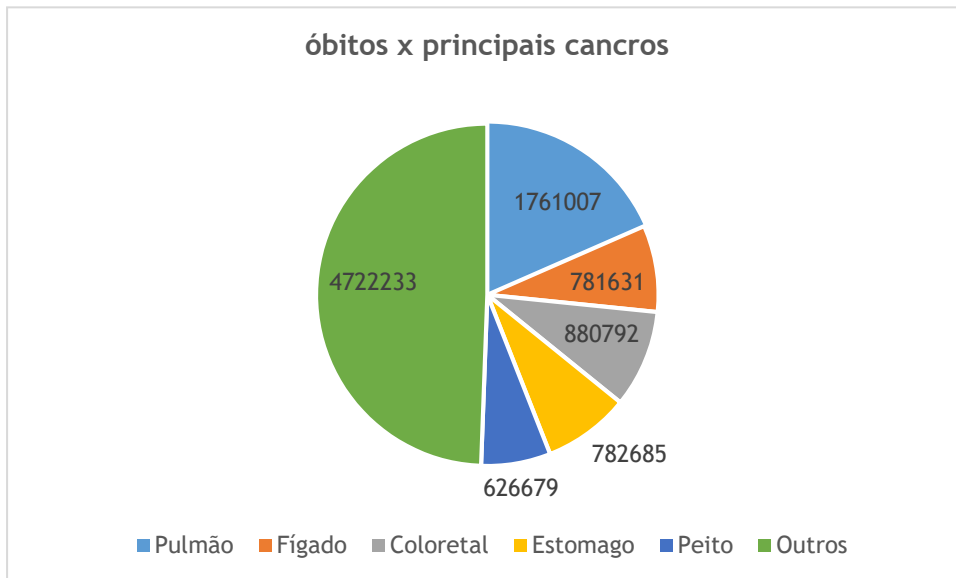


Figura 5: Os cinco principais tipos de cancro responsáveis por maior número de mortes no mundo em 2018

Em Portugal, o cancro foi causa de morte de 17607 homens e 11353 mulheres, de todas as idades, totalizando 28960 casos. Para termos uma ideia, o Figura 6 mostra os 6 tipos de cancro que mais mataram homens e mulheres em Portugal, no ano de 2018.

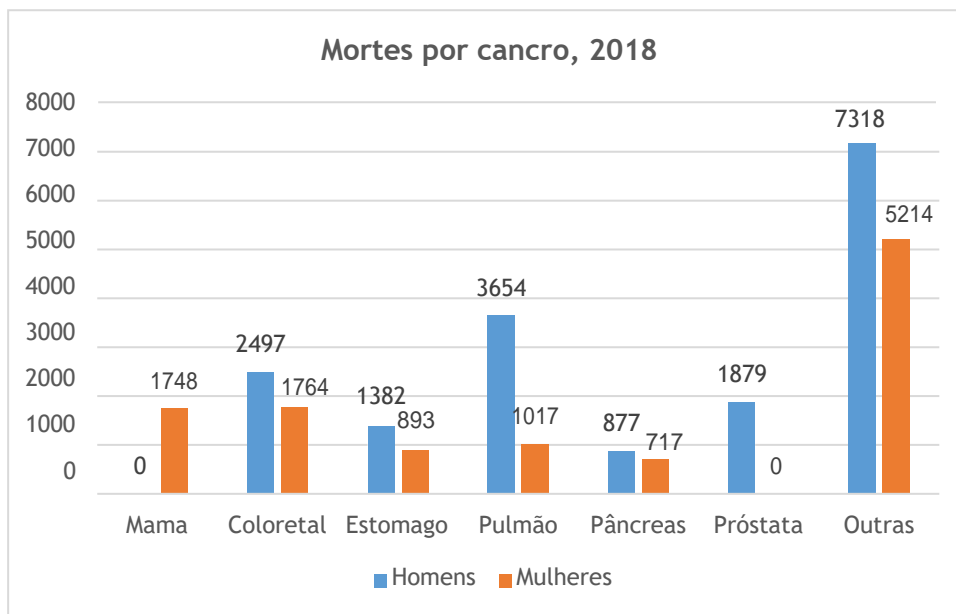


Figura 6: Os principais tipos de cancro que mais mataram em Portugal em 2018

Estima-se ainda que mundialmente até 2030 possam surgir 17 milhões de novos casos de cancro (<http://globocan.iarc.fr/> - consultado 08/08/2018). Estes dados levam a uma crescente preocupação e motivam a pesquisa de novas terapias que possam substituir as convencionais que são na maioria das vezes invasivas, dispendiosas e nem sempre eficazes. As alternativas que têm sido essencialmente investigadas prendem-se com as estratégias de terapia génica, que visam uma melhoria efectiva no tratamento de cancro, considerando o crescente conhecimento acerca dos mecanismos e bases genéticas associadas ao aparecimento e progressão do cancro.

1.4.1 Cancro e sua Base Genética

Danos no material genético da célula, podem levar células normais a sofrer alterações, através de um processo complexo e muitas vezes lento que pode demorar anos. Esse processo acaba por conferir às células algumas vantagens seletivas, como autossuficiência de sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de morte celular, potencial replicativo ilimitado, angiogénese sustentada, capacidade de invadir tecidos (metástases), escape da vigilância imunitária, instabilidade génica, alterações no metabolismo da célula e evasão da apoptose [73,74]. Essas principais características, postuladas como as *hallmarks* chave da maioria dos tipos de cancro, descrevem o tumor e o microambiente por ele formado como forma de adaptação. O cancro é uma doença complexa e quanto mais conhecimento se adquire, mais se reconhece que os mecanismos que o envolvem podem também fornecer novos dados e novas perspectivas para possíveis intervenções e tratamentos da doença. Por exemplo, sabe-se que em tumores sólidos entre 33 a 66 genes se encontram mutados, alterando a expressão dos seus respetivos produtos proteicos, sendo que em alguns casos, como em melanoma e cancro do pulmão, se podem encontrar aproximadamente 200 mutações [75]. Um notável acontecimento é que células cancerígenas têm uma taxa de mutação pontual comparada às células normais e possuem uma taxa de mutação cromossómica muito mais elevada [76]. As mutações cromossómicas são agressivas, mas as células tumorais resistem a estas mutações, ao contrário do que ocorre nas células normais que podem entrar num ciclo apoptótico quando essas mutações ocorrem. Este facto sugere que as células tumorais sobrevivem a toda esta alteração génica por conterem mutações que incapacitam o gene TP53 de responder ao dano do DNA, o que normalmente ocorre em células normais, levando-as a apoptose [75].

1.4.2 Relevância da proteína p53

Para que a divisão celular ocorra, é preciso primeiramente que o DNA se replique e no momento dessa replicação, alguns erros durante a adição de nucleotídeos podem ser cometidos pelas enzimas envolvidas nessa replicação, podendo resultar em mutações no DNA. Quando ocorre algum tipo de mutação, a proteína p53 é ativada. Esta proteína foi inicialmente classificada como oncoproteína, por ter sido identificada ao acaso em um extrato de oncoproteínas de vírus

SV40 [77], mas no final da década de 80, a proteína p53 passa a ser classificada como supressora de tumor, devido às suas propriedades anti-proliferativas [78, 79]. A euforia da descoberta de propriedades anticancerígenas da p53, motivou a realização de estudos mais aprofundados acerca do gene TP53 que codifica para proteína p53 e atualmente a p53 tem sido reconhecida como “guardião do genoma”, pois é notável o facto de que a proteína é ativada em função de várias alterações celulares, como danos no DNA, distúrbios metabólicos, hipóxia, ativação de oncogenes e até privação de nutrientes. Como mecanismos de resposta a esses danos, a p53 pode desencadear um ou vários processos metabólicos para a eliminação do problema, o que pode variar dependendo do tipo celular e *stress* causado [80]. Muitas dessas ações que inibem o crescimento de células anormais e o desenvolvimento do cancro incluem, a interrupção do ciclo celular, reparação do DNA, senescência, autofagia e/ou apoptose [81]. É possível observar que das 10 principais características que as células tumorais apresentam, a insensibilidade a algumas repostas a p53 é das mais relevantes, sugerindo uma inativação dessa proteína, que pode ser ou a nível da expressão génica, ou a nível da atividade da proteína.

A nível de expressão génica, é importante ressaltar que não somente o gene mutado, mas também se o promotor do gene TP53 se encontrar alterado, a produção da proteína pode não ocorrer ou a expressão da proteína pode ser insuficiente para exercer a função de regulação do ciclo celular ou apoptose. Ainda que a correta transcrição da p53 ocorra, a atividade biológica dessa proteína também é dependente da sua configuração tridimensional. Assim sendo, a literatura tem reportado que o gene TP53 se encontra mutado em 50% dos casos de tumores e que em outros 50%, as modificações pós-traducionais podem estar envolvidas na desregulação da sua atividade [82]. É também importante salientar que os níveis de p53 no interior celular são dependentes de alguns reguladores negativos, que são importantes na manutenção dos níveis basais da proteína em células normais, evitando assim uma apoptose desnecessária e descontrolada. Como exemplo, podemos mencionar o principal regulador da p53, o gene *Murine Double Minute 2 (MDM2)* que quando superexpresso suprime a expressão da proteína p53, seja pela regulação do gene ou pela degradação da proteína [83].

Considerando estes factos, é razoável incluir o gene TP53 em tratamentos de terapia génica que visam a intervenção no cancro, uma vez que a substituição do gene danificado pelo gene normal poderia reestabelecer a função da proteína [84] e de facto a terapia génica antitumoral baseada no gene TP53 tem se mostrado de alguma forma eficaz considerando o sucesso do primeiro produto de terapia génica, o Gendicine, usado para o tratamento de cancro de cabeça e pescoço [85]. De 185 ensaios clínicos que usam genes supressores de tumor, 103 usam adenovírus como vetor de entrega e apenas 17 usam vetores não virais, como os plasmídeos. No presente trabalho, o gene TP53 clonado em um plasmídeo, representa uma estratégia interessante para promover a expressão da proteína p53 e controlar a proliferação de células tumorais, por indução da apoptose.

1.5 Processo Biotecnológico para obtenção de pDNA

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular, que estão no citoplasma das células hospedeiras, apresentando-se como moléculas independentes do cromossoma e portanto auto-replicativas [86]. Estas moléculas são naturalmente encontrados em bactérias, archaea e alguns eucariotas [29], sendo os plasmídeos de origem bacteriana os melhores caracterizados e amplamente difundidos em várias áreas relacionadas com a Tecnologia do DNA Recombinante. Os plasmídeos são moléculas versáteis e relativamente fáceis de manipular, sendo que com auxílio de enzimas de restrição, é possível retirar ou inserir genes conforme a necessidade da pesquisa a realizar [87]. Desde a primeira construção de uma molécula de DNA recombinante por Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang, and Stanley Cohen em 1973 [88], a tecnologia do DNA recombinante tem impulsionado a investigação em diferentes campos, nomeadamente para a melhoria das condições de saúde, no sentido de desenvolver novos fármacos e produtos para terapia génica [88]. Os plasmídeos com finalidade terapêutica, geralmente incluem uma *cassete* de expressão, que é constituída por uma região contendo um promotor eucariótico, que é responsável pela ligação dos fatores de transcrição bem como regular a expressão do gene; o gene de interesse, que no caso do presente trabalho é o gene TP53 e uma região de poliadelinação que além de ajudar na regulação da expressão, também pode conferir resistência à degradação por nucleases celulares. Para além destes elementos, o plasmídeo inclui também regiões para o início da replicação na célula bacteriana hospedeira, bem como uma marca de seleção para identificação das células que contêm o plasmídeo de interesse [89]. No caso do presente trabalho, o mapa do plasmídeo construído pelo Dr. Thomas Roberts, detalhando as distintas regiões da molécula, pode ser visualizado na figura 7.

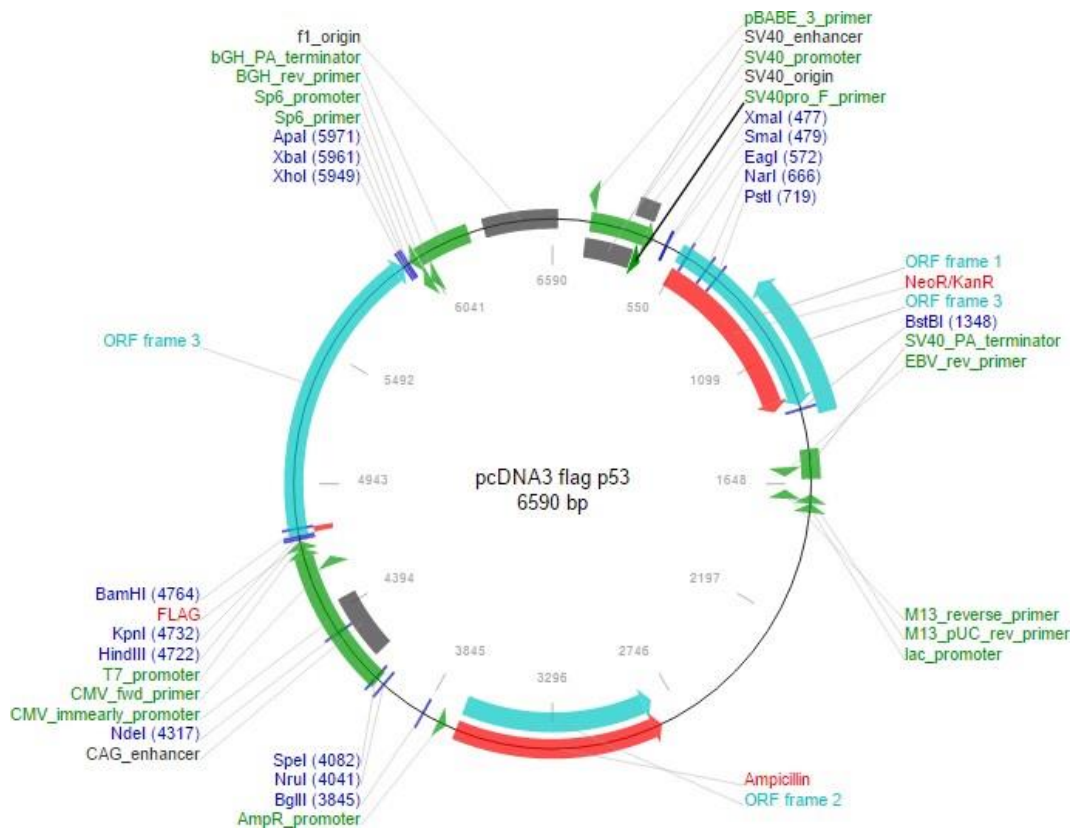


Figura 7: Mapa do plasmídeo construído pelo Dr. Thomas Roberts [1], usado no presente trabalho (Addgene, Cambridge, MA, USA - plasmídeo 10838), com identificação das seguintes regiões: Local de múltipla clonagem; Promotores; gene marcador de seleção. Imagem retirada (<http://www.addgene.org/10838/>)

1.5.1 Biossíntese e recuperação do DNA plasmídico

Após o desenho e construção dos vetores, estes são inseridos numa célula bacteriana hospedeira, garantindo assim o armazenamento desta informação genética. Em posse desse banco genético, as células podem então crescer em meios de cultura adequados, com controlo de temperatura, agitação e oxigenação para a multiplicação desse plasmídeo no interior das células. A esse procedimento dá-se o nome de fermentação e durante essa etapa, os plasmídeos podem representar um aumento de carga metabólica para a célula hospedeira no momento do crescimento [90]. As células de *Escherichia coli* podem conter vários tipos de plasmídeos e a isso se deve a preferência pelo uso deste tipo de células em várias pesquisas laboratoriais [91], mas também por ser uma bactéria amplamente estudada, o que facilita um melhor controlo da produção, uma vez que são conhecidas as necessidades nutricionais e as etapas de crescimento dessa célula bacteriana [92]. Após a etapa de crescimento celular, é preciso recuperar a massa de células para obtenção do plasmídeo, o que é feito pelo procedimento de lise alcalina. A lise alcalina, consiste na rutura da parede e membrana da célula bacteriana, sendo o método desenvolvido por Birboim e Doly, 1979, o mais utilizado. Em primeiro lugar, uma solução tampão adequada (Tris; EDTA; Glucose) é usada para a ressuspensão da massa celular, previamente

recuperada da fermentação, onde o EDTA inativa as DNAses impedindo a degradação do material genético de interesse e a glucose irá manter a pressão osmótica da célula o que irá impedir a ruptura da célula nesse momento inicial [93]. Na maioria dos protocolos usados, a RNase também é aplicada nesta etapa, para promover a degradação do RNA. Posteriormente, é realizado então o processo de lise alcalina propriamente dito, recorrendo ao tampão de lise (NaOH; SDS), onde o SDS solubiliza a membrana celular e o NaOH ajuda a romper a parede celular além de quebrar as pontes de hidrogênio que mantêm as bases azotadas do DNA unidas por complementaridade, convertendo o DNA de cadeia dupla em cadeia simples. Este processo de desnaturação ocorre tanto com o pDNA como com o gDNA, e é a etapa principal do processo de lise alcalina. Finalmente, uma terceira solução é utilizada para a neutralização da reação anterior. Nessa etapa, um tampão ácido de neutralização (acetato de potássio) irá renaturar seletivamente o pDNA, não acontecendo o mesmo com a maioria do gDNA em solução, sendo este precipitado juntamente com os restos celulares [94]. Durante todo o procedimento de extração do pDNA, deverá ter-se em atenção o tipo de manipulação realizada, uma vez que o DNA (gDNA e pDNA) pode sofrer clivagem e resultar na formação de fragmentos menores, o que dificultaria a sua posterior remoção. A literatura reporta que plasmídeos maiores que 5 kb são mais suscetíveis à degradação, comparando com os plasmídeos de menor tamanho [30]. Em pequena escala, os kits de purificação de pDNA existentes, representam uma boa opção para uma extração livre de impurezas, mas por fazerem uso de enzimas como a RNase, o processo torna-se caro e não viável para produção em larga escala, até porque as agências reguladoras não recomendam o uso de RNase nos procedimentos de extração de DNA [95]. Um protocolo de lise alcalina modificada que tem uma etapa de precipitação parcial de proteínas, endotoxinas e RNA, por sulfato de amônio, tem sido uma boa alternativa para a preparação do material genético de interesse em processos de maior escala [96]. Após a finalização dos procedimentos de lise celular diversas impurezas ainda permanecem no extrato, como proteínas, gDNA, endotoxinas, RNA e outras moléculas, que contaminam a molécula de interesse (pDNA) que geralmente se apresenta sob três isoformas (linear [ln], circular aberta [oc - do inglês *open circle*], e superenrolado [sc - do inglês *supercoiled*]), sendo que a isoforma de interesse é sc pDNA. A figura 8 mostra os possíveis e principais contaminantes do lisado após a preparação.

CONSTITUINTES LISADO

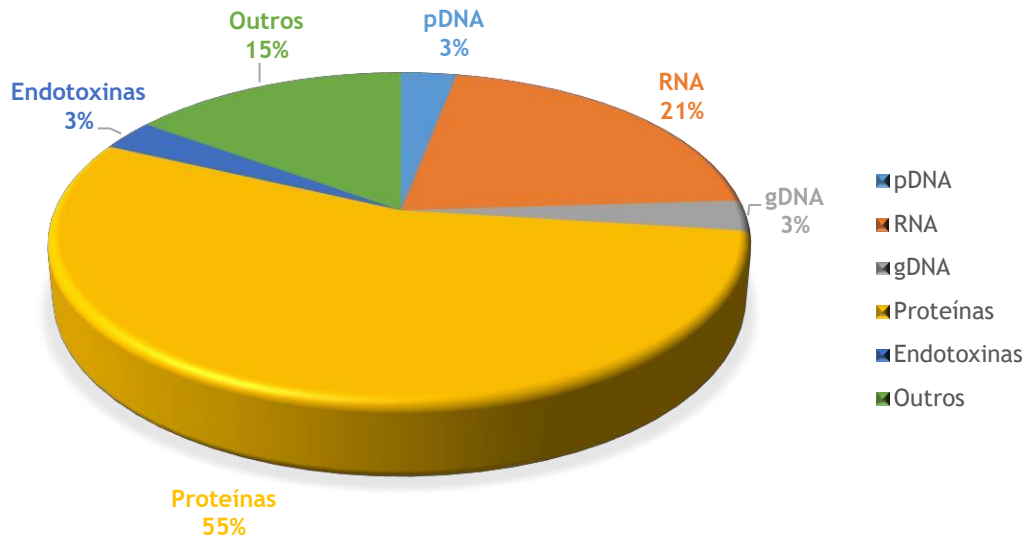


Figura 8: Principais constituintes do lisado bacteriano.

Esses contaminantes representam o principal desafio a ser considerado para a obtenção do sc pDNA com grau de pureza adequado à aplicação terapêutica, nomeadamente em terapia génica, cumprindo os parâmetros recomendados pelas agências reguladoras [95]. As proteínas que representam 55% da composição do lisado, são as macromoléculas mais heterogêneas, variando em tamanho, carga e peso. Foi estimado que a *E. coli*, contém aproximadamente 4416 proteínas (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/). Essa diversidade proteica pode representar riscos à aplicação do pDNA, já que podem desencadear respostas imunes e alergias. A quantidade imunogénica mínima, depende das características da proteína vestigial, tendo sido relatadas respostas imunes com menos de 1ng de proteína contaminante [97]. Os RNAs que representam 21% dos constituintes do lisado, são macromoléculas de grande semelhança à molécula de DNA, apresentando cadeia simples, e constituídas por grupos açúcar-fosfato ligados a bases nucleotídicas. O RNA representa risco se estiver presente aquando da aplicação terapêutica do pDNA, pois pode emparelhar com moléculas de mRNA no interior da célula transfetada, ocasionando então um possível silenciamento da expressão do gene. A contaminação por DNA genómico, que corresponde a 3% do lisado, representa um problema maior considerando que essa molécula pode integrar-se no genoma das células transfetadas, podendo desencadear a inativação de genes supressores de tumor e consequentemente a ativação de oncogenes [98]. O gDNA, ainda pode estar presente no lisado, mesmo após todo o cuidado durante a extração, uma vez que as alterações de pH durante a lise, ou mesmo forças de cisalhamento resultantes da alteração da viscosidade do meio, podem fragmentar essa molécula, o que torna difícil a remoção desse contaminante. As endotoxinas fazem parte da composição da parede celular de *E. coli* [99], hospedeira do plasmídeo e representa 3% dos constituintes do lisado. É uma

molécula aniônica, hidrofóbica e apresenta atividade altamente pirogênica no organismo humano, podendo desencadear uma situação de choque séptico irreversível, quando em doses elevadas [100]. Relativamente ao pDNA, é importante realçar que da pequena fração de 3% presente no lisado, fazem parte todas as isoformas do plasmídeo (oc, ln e sc) [101], bem como possíveis formas desnaturadas ou agregados. Sendo assim, é normalmente necessário um método posterior que garanta a completa remoção dos contaminantes do lisado, para uma purificação do sc pDNA em grau terapêutico, uma vez que para além das reações adversas que podem ocorrer, a presença de algum contaminante pode comprometer as etapas posteriores de transfeção *in vitro*.

1.5.2 Cromatografia de Afinidade para purificação de pDNA

Como mencionado no tópico anterior, o lisado celular que contém pDNA é bastante heterogéneo no que se refere às moléculas presentes no extrato. Um grande desafio para a purificação seletiva do sc pDNA é que esses contaminantes do lisado partilham muitas características físico-químicas [95], conforme mostra a tabela 6.

Tabela 6: Características físico-químicas dos diferentes constituintes do lisado [94, 102].

Características	oc pDNA	sc pDNA	gDNA	RNA	Endotoxinas	Proteínas
Tamanho (kDa)	~3,9 x 10 ³		Fragmentado	28 ^a 1000	10 a 20	< 200
Carga (-/+)	Polianiónico				Aniónica	Heterogénea
Hidrofobicidade	Baixa		Baixa	Moderada	Hidrofóbica (lipídio A)	Heterogénea
Cadeia	Dupla		Simples/dupla	Simples	---	---
Exposição Bases azotadas	Não	Sim	Não	Sim	---	---
Topologia ácido nucleico	Circular aberto	Superenrolado	Linear (cadeia simples/dupla)	Pode variar	---	---

Os processos realizados durante a lise celular e clarificação, usando isopropranol e sulfato de amónio, não garantem a total eliminação das impurezas do extrato para uso terapêutico do sc pDNA. Considerando as reações adversas que os contaminantes podem causar nas células humanas, as agências reguladoras estabeleceram então critérios para o uso do material genético em procedimentos terapêuticos, conforme mostrado na tabela 7. Para o cumprimento dessas exigências, uma técnica que se tem mostrado eficaz, robusta e muito usada para a purificação de produtos farmacêuticos, tem sido a cromatografia [94, 105].

Tabela 7: Limites estabelecidos pelas agências reguladoras para produtos terapêuticos. Adaptado [103, 104]

Parâmetros	Limite estabelecido	Técnica Analítica
Homogeneidade sc pDNA	>90%	AGE, CGE, HPLC
Presença de Proteínas	Não detetável	Ácido Bicinconínico
Presença de RNA	Não detetável	AGE
Presença gDNA	< 0.01 µg/µg pDNA	PCR
Presença de endotoxinas	< 0.1 EU/ µg pDNA	LAL

Na cromatografia líquida, uma mistura contendo diferentes moléculas, por exemplo, o extrato celular, é injetado em uma coluna que contém uma matriz modificada com ligandos, para que ocorra interação entre as moléculas do extrato celular e a matriz, auxiliado por um tampão utilizado na fase móvel. Esta fase móvel terá uma composição específica, podendo recorrer à utilização de sais, e condições de pH, que são estabelecidas em função das características e estabilidade das moléculas a isolar, de forma a promover e explorar interações adequadas com o suporte cromatográfico. Com a interação diferencial entre as moléculas e a matriz, ocorre a separação em função das interações estabelecidas e da força dessa interação, sendo que a qualidade dessa separação irá variar em função da fase estacionária (matriz) a ser utilizada, bem como a molécula alvo [106]. A cromatografia líquida tem sido amplamente usada em processos biotecnológicos para a separação de metabolitos secundários, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e vírus, explorando as diferentes interações entre os solutos presentes na mistura, com ligandos específicos da fase estacionária [107]. As diferentes estratégias cromatográficas a serem utilizadas, devem considerar as características físico-químicas das moléculas a separar, como diferenças do tamanho, polaridade, características de hidrofobicidade, bem como a conformação das moléculas [94, 108]. A figura 9 relaciona os tipos de cromatografia mais usados na purificação de plasmídeos, bem como algumas vantagens e desvantagens associadas aos métodos.

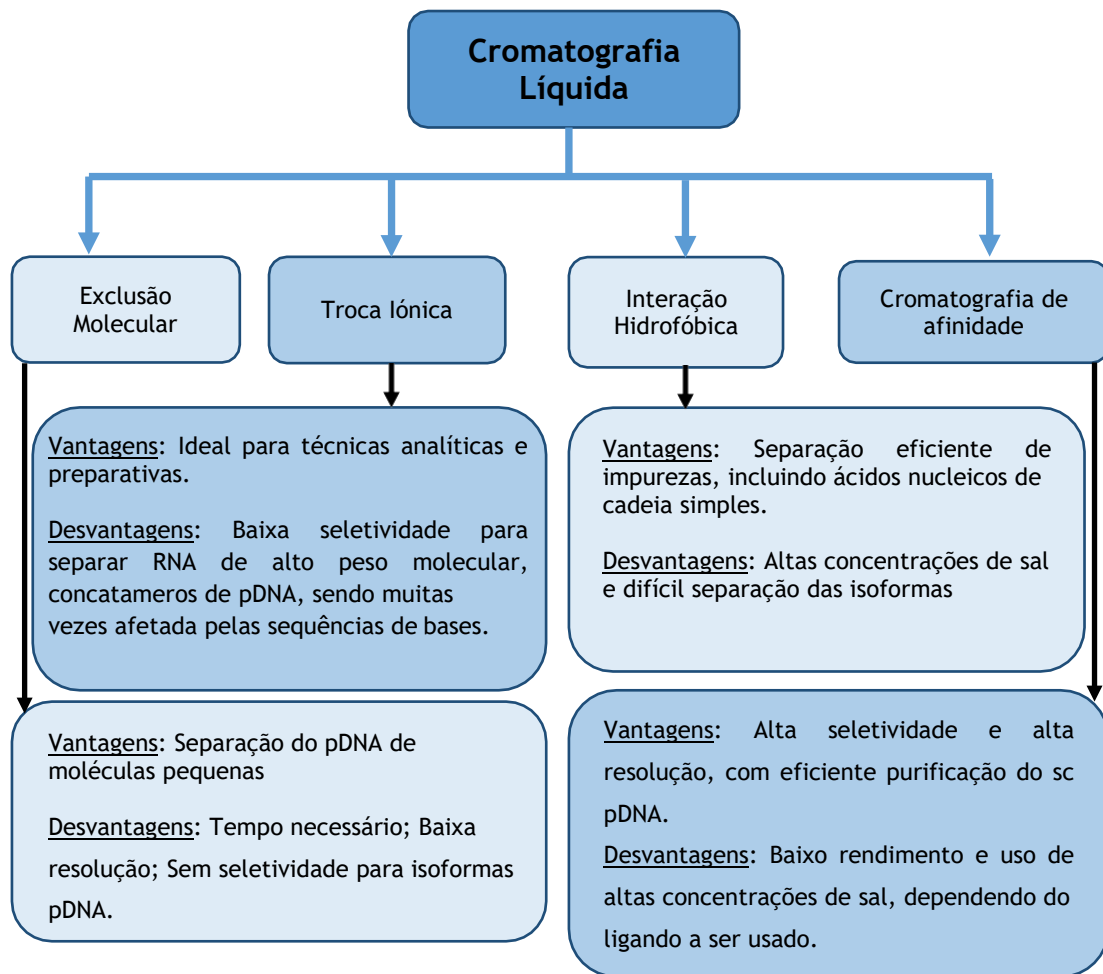


Figura 9: Principais tipos de cromatografia líquida usados na purificação de pDNA, suas vantagens e desvantagens.

A cromatografia baseada na exclusão molecular tem sido usada na separação de moléculas com base no tamanho, não possibilitando a separação entre isoformas do plasmídeo [104]. Já a cromatografia de troca aniônica baseia-se na interação eletrostática entre os grupos fosfato carregados negativamente na molécula de DNA e os ligandos da fase estacionária que são carregados positivamente [94, 109], sendo esta a técnica usada na maioria dos kits comerciais para a purificação de pDNA. A cromatografia de interação hidrofóbica tem como fundamento de separação as interações hidrofóbicas entre os ácidos nucleicos (nomeadamente as bases azotadas) e regiões hidrofóbicas dos ligandos da fase estacionária, e essas interações são também intensificadas com o uso de alguns tipos de sais especialmente os cosmotrópicos, como por exemplo o sulfato de amónio [94, 107].

A crescente necessidade de obter diferentes produtos biológicos com finalidades terapêuticas, com elevado grau de pureza e respeitando as exigências das agências reguladoras, exige o desenvolvimento de métodos robustos, eficazes e cada vez mais seletivos na separação das moléculas alvo de impurezas, preservando a bioatividade das moléculas de interesse [110]. Neste sentido surge o conceito de cromatografia de afinidade, que se destaca das outras abordagens pelo facto de usar basicamente ligandos biológicos e explorar não somente uma,

mas vários tipos de interações entre ligandos e molécula alvo, nomeadamente as interações eletrostáticas, hidrofóbicas, de van der Waals e/ou pontes de hidrogénio [108,111,112]. Estas interações podem ser facilmente favorecidas ou desfavorecidas com simples ajustes na temperatura, composição da fase móvel e pH, permitindo aumentar a seletividade na separação entre as moléculas alvo e as impurezas. De facto, esta abordagem mimetiza muitas interações moleculares que ocorrem nos sistemas biológicos, a nível celular, reforçando o potencial desta metodologia. A cromatografia de afinidade que primeiro foi desenhada para purificação de proteínas, tem sido também usada com sucesso para a purificação de plasmídeos terapêuticos, recorrendo a diferentes abordagens como descrito de seguida.

Na cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados (*Immobilized metal ion affinity chromatography* - IMAC), os iões metálicos são imobilizados em suportes cromatográficos com o uso de agentes quelantes, como ácido iminodiacético, ácido nitrilotriacético, ácido carboximetilado-aspártico e ácido L-glutâmico. Os ligandos mais utilizados são Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} em conformidade com o tipo de molécula alvo que devido a regiões específicas, ficará retida na coluna. As interações de afinidade entre os ligandos e ácidos nucleicos ocorrem maioritariamente nas regiões ricas em purinas (A/G), sendo que a ligação entre bases de pirimidina (T/C) são de 60 a 300 vezes mais fracas [113]. Os átomos envolvidos nessas ligações, são essencialmente os de nitrogénio presentes nas bases azotadas, e de alguma forma a maior desvantagem associada a esta metodologia é o facto de a retenção de plasmídeos ser muito limitada ou inexistente, devido à menor exposição das bases [108]. Em IMAC, a eluição da molécula alvo é maioritariamente promovida por utilização de agentes de competição, bem como alteração de pH [114].

Numa outra abordagem, a cromatografia de afinidade de tripla hélice (*Triple-helix affinity chromatography* - THAC), explora a capacidade do DNA em formar uma tripla hélice com o ligando. Neste caso, o ligando é um oligonucleotídeo imobilizado covalentemente no suporte cromatográfico, que por ser complementar com uma sequência do pDNA alvo, irá estabelecer um emparelhamento através de ligações de hidrogénio de Hoogsteen onde a timina (T) reconhece a adenina (A) formando o triplex (TA-T) e a citosina protonada (C^+) reconhece a guanina, formando o triplex CG- C^+ [94]. As desvantagens do uso da THAC estão associadas quer ao tempo necessário para a formação da tripla hélice, bem como o baixo rendimento de recuperação do pDNA [108, 115], para além do facto de os ligandos serem muito específicos para uma determinada molécula de pDNA que possua na sua estrutura uma sequência muito particular, inviabilizando a aplicação para outras moléculas de diferente composição.

A cromatografia de afinidade Proteína-DNA explora basicamente o reconhecimento de determinadas sequências de DNA por domínios de ligação de proteínas. Neste caso são pequenos domínios peptídicos de ligação a DNA que são usados como ligandos de afinidade. Um exemplo desse tipo de cromatografia foi mostrado por Woodgate e colaboradores (2002), onde foi usada uma matriz contendo uma proteína de fusão *Zinc Finger* (ZN)-glutathione-s-transferase (GST),

para o reconhecimento de uma sequência específica do DNA (5´-GGGGCGGCT-3´) [116]. Os autores mostraram a possibilidade de purificar DNA plasmídico contendo esta sequência específica através da interação com o domínio ZN, enquanto que o domínio GST permaneceu imobilizado na matriz cromatográfica, formando o complexo sepharose-glutathione. Para eluição do DNA, os autores usaram glutathione reduzida, como agente de competição. Apesar da recuperação do plasmídeo ter sido livre de gDNA e de proteínas da célula hospedeira, o baixo rendimento obtido na purificação, representa uma grande desvantagem dessa técnica [117, 108,94]. De facto, interações DNA/proteína ocorrem com frequência no interior das células e desempenham funções vitais para o metabolismo celular, onde proteínas estão envolvidas não apenas no dogma central da biologia molecular, replicação, transcrição e tradução, mas também no empacotamento do material genético, seja para proteção do DNA ou simplesmente para regular a expressão de um determinado gene, como ocorre na formação da eucromatina e heterocromatina em humanos [118]. Essas interações proteína/DNA podem ser bem específicas, determinadas pelas interações atômicas entre as bases dos nucleotídeos e os aminoácidos constituintes da proteína, envolvendo basicamente forças eletrostáticas, van der Waals, interações hidrofóbicas e até pontes de hidrogénio [119]. Analogamente ao que acontece *in vivo*, a cromatografia de afinidade com aminoácidos, mimetiza as interações ocorridas no interior da célula e é uma abordagem robusta, simples e promissora no que se refere a purificação e preservação da bioatividade de biomoléculas. A primeira metodologia do género que se tem notícia, foi o uso do aminoácido histidina para purificação da imunoglobulina G, onde os autores indicaram também a alta versatilidade do uso da histidina para purificação de moléculas biológicas [120]. Dessa forma, o uso de aminoácidos passou também a ser explorado para a purificação de DNA, onde diversos trabalhos prévios demonstraram a eficácia dessa abordagem na purificação de plasmídeos, e particularmente da isoforma superenrolada. Em 2006, o suporte de histidina-sepharose foi usado para a separação da isoforma superenrolada do plasmídeo pVAX1-*LacZ* (6,05 kbp), a partir do lisado clarificado de células de *E. coli*, com uma pureza de aproximadamente 100%, mantendo os níveis de impurezas abaixo dos limites recomendados pelas agências reguladoras. A taxa de recuperação da isoforma sc pDNA foi de 45% [112]. Também um suporte monolítico modificado com o mesmo ligando, a histidina, foi usado com sucesso na purificação da isoforma superenrolada do plasmídeo HPV- 16 E6/E7 pDNA, a partir do lisado clarificado. Neste caso, a eficácia foi comprovada com uma pureza da isoforma superenrolada de 99% e uma taxa de recuperação do sc pDNA de 74%, tendo sido possível o aumento da capacidade de ligação, devido à utilização do suporte monolítico que se apresenta mais vantajoso para a purificação de biomoléculas de maiores dimensões [121]. As interações descritas entre a matriz de histidina e o pDNA foram maioritariamente hidrofóbicas, apesar do envolvimento de outras interações não covalentes, fracas, que contribuem para o biorechecimento da molécula alvo. Também o suporte de arginina- sepharose foi usado para a purificação do sc pDNA pVAX1-*LacZ* (6,05 kbp), a partir do lisado clarificado, garantindo uma pureza aproximada de 100% da isoforma sc pDNA e uma recuperação de 79% dessa molécula [111], sendo uma metodologia que permitiu a utilização de

condições experimentais menos agressivas, uma vez que explora interações maioritariamente eletrostáticas, diferente da histidina que requer o uso de altas concentrações de sulfato de amónio para promover as interações hidrofóbicas e sendo assim, é natural que a purificação pela matriz de arginina permita a estabilização do pDNA e potencie a sua aplicação nos ensaios com células. Outros aminoácidos, como a metionina [117], lisina [118], tirosina e triptofano [119] foram igualmente usados na purificação de diferentes plasmídeos (com diversos tamanhos e composições), sendo possível a purificação seletiva da isoforma sc em todos os casos, podendo variar de alguma forma o rendimento de recuperação. No entanto, nesta vertente de purificação de pDNA com aminoácidos, alguns desafios precisam ainda ser ultrapassados para otimizar o processo, reduzindo custos associados, visto que embora a pureza das amostras purificadas estejam em concordância com os padrões requeridos para produtos farmacêuticos, o rendimento obtido ainda necessita ser melhorado, no sentido de maximizar a produção. A robustez e versatilidade da cromatografia de afinidade usando aminoácidos como ligandos, sugerem que esta poderá ser uma abordagem com elevado potencial na purificação da isoforma superenrolada do plasmídeo terapêutico em escala industrial. Um ponto positivo que distingue esta de outras cromatografias de afinidade, é o facto de não ser necessária uma sequência específica dentro da molécula terapêutica, como no caso da *THAC* e proteína/DNA, para que os ligandos reconheçam o pDNA. No entanto, devido às diferenças entre plasmídeos, em termos de constituição do DNA, tamanho e formas, alguns ajustes de parâmetros cromatográficos são necessários (temperatura, força iónica, pH) para adaptar cada metodologia a uma molécula particular, o que requer algum trabalho de otimização. Considerando a necessidade também de se manter a bioatividade da molécula a ser purificada, é preciso ter em conta todos esses parâmetros ao longo de todo o processo de purificação. Relativamente aos suportes usados para a imobilização de aminoácidos, a utilização de resinas esféricas porosas, como a sepharose, pode apresentar algumas limitações, como o baixo coeficiente de difusão que resulta em uma limitada transferência de massa, uma disponibilidade limitada da área de superfície para ligação da molécula alvo, ou o aumento de pressão interna da coluna. O efeito e limitação real destes fatores na purificação de uma dada biomolécula, depende da complexidade do extrato celular e principalmente do tamanho da biomolécula, e por isso no caso dos plasmídeos, deverá ser considerado. Suportes projetados para moléculas de maiores dimensões, como os plasmídeos, representam a nova geração de suportes para superar as limitações dos suportes convencionais, que inicialmente foram desenhados para moléculas de dimensões menores, como as proteínas [122]. No presente trabalho, um suporte macroporoso funcionalizado com arginina foi usado para purificação da isoforma sc pDNA-p53, visto que este suporte foi previamente utilizado com sucesso na purificação do plasmídeo a partir de uma amostra pré-purificada com um Kit comercial [123]. O uso do suporte macroporoso pode representar uma vantagem, por permitir o acesso da molécula alvo ao interior dos poros do suporte, onde também devem estar presentes ligandos de arginina, aumentando a área superficial de contato para a interação ligando/ligante [122]. Representando também a nova geração de suportes, um monolito modificado com ligando de histidina, que foi já anteriormente utilizado na purificação

de outros plasmídeos [121], foi usado neste trabalho pela vantagem de ser um suporte com melhores propriedades de transferência de massa, com maior capacidade de ligação e que permite a purificação de pDNA de uma forma mais rápida, contribuindo para a sua estabilidade. O tamanho dos poros são dependentes das condições de polimerização usada [102], por isso os coeficientes de difusão não serão os mesmos para plasmídeos de diferentes tamanhos.

1.6 Condições que influenciam a estabilidade e atividade do pDNA

Conforme mencionado no tópico anterior, o ajuste das condições de purificação é muitas vezes necessário para alcançar a resolução e recuperação da molécula alvo. No entanto, a manipulação das condições de temperatura, pH, caudal e/ou composição da fase móvel deve ser realizada, considerando não somente o comportamento de interação DNA/ligando, mas também garantindo a estabilidade da molécula alvo principalmente para a preservação da bioatividade do plasmídeo. A preferência para purificar a isoforma sc pDNA com alto grau de pureza e recuperação, deve-se ao facto de essa topologia apresentar uma maior energia livre de ativação, que se deve ao grau de enrolamento negativo que ajuda a promover a descompactação da molécula, facilitando o acesso pelos fatores de transcrição do gene [124], além disso a isoforma mais compacta, tem sido reportada na literatura por apresentar uma melhor taxa de encapsulação e transfeção celular [125]. Para além disso, a isoforma superenrolada possui toda sua constituição génica intacta, ao contrário das outras isoformas do plasmídeo, circular aberta e linear, que resultam da ruptura em uma ou nas duas cadeias, respetivamente. Considerando o facto de que essa compactação protege e regula a expressão de genes [126], é de esperar que o pDNA se encontre maioritariamente na isoforma superenrolada e compactada, no interior da célula de *E. coli* [127]. O maior desafio na obtenção da isoforma sc pDNA reside no facto de que essa topologia pode ser alterada não somente por enzimas bacterianas, mas pelos procedimentos químicos usados durante a extração que podem influenciar as ligações responsáveis por manter a integridade da molécula [128]. Considerando que o dano pode ocorrer em alguma região promotora do gene ou no próprio gene de interesse, a recuperação destas isoformas (ln pDNA e oc pDNA) deve ser evitada, já que a clivagem aleatória poderia impedir a transcrição, ainda que o material genético entrasse no núcleo [101]. Por estas razões, as agências reguladoras determinam que o plasmídeo a ser usado terapêuticamente deve apresentar-se na isoforma sc pDNA, numa percentagem superior a 90%, conforme mencionado na tabela 7. Afim de se estabilizar a isoforma sc pDNA e consequentemente manter a sua bioatividade, o estudo e controlo de alguns parâmetros é extremamente importante. Um exemplo relativo ao controlo de pH é o que deve ser considerado para as soluções de lise alcalina, cujo pH deve ser monitorizado de forma a serem evitados danos na estrutura do DNA, especialmente o pH do tampão de lise que deve ser mantido entre 12,0 e 12,5, pois assim a molécula de pDNA não é totalmente desnaturada, já que alguns pares de base ainda permanecem unidos o que facilita a correta renaturação na etapa posterior de neutralização com a adição de acetato de potássio. Caso o pH dessa solução ultrapasse o valor limite de 12,5, a molécula de pDNA sofre danos irreversíveis [107]. Afim de

se eliminar possíveis problemas em consequência do pH das soluções, a temperatura de armazenamento também deve ser controlada, já que alterações do ambiente podem alterar o pH, também a concentração celular deve ser rigorosamente controlada, uma vez que os constituintes celulares podem levar também a alteração do pH da solução no momento da extração, comprometendo os rendimentos finais da molécula intacta de sc pDNA [107]. No DNA, a alteração de pH pode provocar depurinação, que corresponde à quebra das ligações que unem bases puricas (guanina e adenina) ao esqueleto açúcar-fosfato do DNA, transformando em sítios apurínicos, seguido da quebra da ligação fosfodiéster do DNA, por β -eliminação, que resulta na eliminação da base respetiva [107].

O efeito da temperatura na estabilidade do DNA também deve ser considerado, uma vez que a isoforma superenrolada do pDNA é sensível ao aumento da temperatura do meio em que se encontra, podendo ocorrer alteração no enrolamento das hélices do DNA, causando uma transição da isoforma superenrolada do pDNA para a isoforma relaxada, e em casos de maior alteração pode mesmo ocorrer ruptura das interações por pontes de hidrogénio que mantêm unidas as bases azotadas complementares [129]. A desnaturação do DNA pelo aumento da temperatura varia em conformidade com o tamanho, constituição e topologia da molécula, considerando que moléculas de DNA com alto teor de guanina-citosina (GC) são mais resistentes à desnaturação, quando comparadas às moléculas ricas em adenina-timina (AT) e isso se deve ao facto de se estabelecerem três pontes de hidrogénio entre as bases GC e duas pontes de hidrogénio entre as bases AT [130].

A molécula de pDNA apresenta também sensibilidade aos efeitos da força iónica, que irá variar com o tipo e concentração de sal. Por exemplo, em condições fisiológicas, sob baixas concentrações de sal, o DNA encontra-se na conformação B, podendo assumir outras conformações em ambientes com elevadas concentrações de sal, como as conformações A e Z que diferem especialmente pelo diâmetro e tipo de rotação da hélice [131]. Em concentrações ideais, o efeito exercido pelo NaCl, reduz as forças de repulsão do DNA que são originadas pelas cargas negativas da molécula que acaba por ter algumas regiões neutralizadas, consoante a quantidade de iões positivos presentes, reduzindo o diâmetro da dupla hélice [107]. Relativamente às etapas que antecedem a cromatografia, especialmente na extração do DNA, o efeito de cada parâmetro é relativamente bem estudado e conhecido, o que possibilita um maior controlo e definição de melhores estratégias para a obtenção de pDNA intacto. No entanto, esses parâmetros também exercem efeitos nas etapas posteriores, que compreendem a purificação cromatográfica e formulação e por isso devem igualmente ser alvo de estudo e otimização [110]. Assim, o presente estudo pretende compreender a influência desses parâmetros na bioatividade do plasmídeo e verificar se eventualmente estas alterações podem ser significativas na expressão do gene terapêutico, considerando a influência na topologia da molécula.

Capítulo 2

2 Objetivos

2.1 Gerais

O objectivo global deste projeto é o desenvolvimento de uma plataforma biotecnológica para a purificação do plasmídeo pcDNA3 flag p53 com potencial aplicação na terapia do cancro e a avaliação da influência das condições de purificação do plasmídeo na sua atividade biológica. O desenvolvimento deste projeto envolve a purificação de pDNA que codifica p53 com diferentes estratégias de cromatografia de afinidade com aminoácidos, ou derivados, como ligandos. Com o trabalho proposto pretende-se igualmente avaliar o efeito das diferentes condições experimentais usadas, na atividade biológica do plasmídeo, através da realização de ensaios *in vitro*. O estudo da eficiência de transfecção, acompanhando a entrada do DNA na célula e a sua distribuição até ao núcleo, assim como a quantificação da expressão da proteína p53 e avaliação dos níveis de apoptose permitirão concluir sobre as melhores condições de purificação para obtenção do produto terapêutico com elevada eficácia.

2.2 Específicos

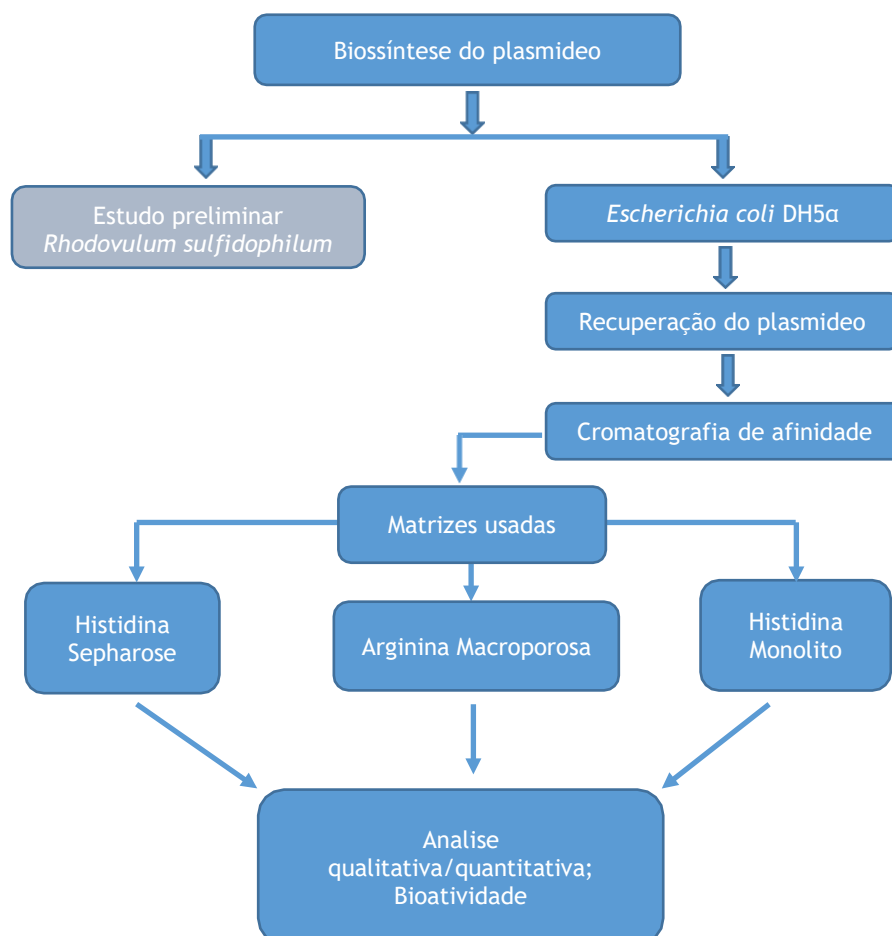


Figura 10: Diagrama esquemático detalhando as etapas específicas do trabalho

Capítulo 3

3 Material e métodos

3.1 Biossíntese p53-pDNA

A multiplicação do plasmídeo ocorre no interior de células bacterianas. Para a biossíntese do plasmídeo, foi inicialmente testada a bactéria *Rhodovulum sulfidophilum* que poderia ser usada como alternativa ao uso da *Escherichia coli*, que foi posteriormente usada ao longo do trabalho.

3.1.1 *Rhodovulum sulfidophilum*-Estudo preliminar

Células termocompetentes de *Rhodovulum sulfidophilum* DSM 1374 (ATCC® Number 35886™, Taxonomy ID 1188256), armazenadas a -80°C, foram usadas em procedimentos de transformação, usando 0,1; 0,4 e 1,5 ng de plasmídeo, sendo realizado um choque térmico de 2 min a 35°C como previamente estabelecido (Figura 11). Para o crescimento celular de *R. sulfidophilum* contendo o pcDNA3 flag p53, utilizou-se meio sólido MT (30 g/L NaCl; 10 g/L glucose; 5 g/L Extrato de levedura; 10 g/L peptona; 4,1 g/L cloreto de magnésio; 10 mg/L sulfato de ferro heptahidratado; 10 mg/L sulfato de manganês tetra hidratado; 10 mg/L sulfato de zinco hepta hidratado; 15 g/L ágar) e as células foram colocadas na estufa para incubação a 30 °C por 5 dias para o crescimento. Após esse período, as células foram então transferidas para tubos contendo 3 mL de meio líquido (5 g/L Polipeptona; 10 g/L triptona; 500 mg/L extrato de levedura; 30 g/L NaCl; 4 g/L; 4 g/L K₂HPO₄; 1 g/L KH₂PO₄; 20 g/L glucose; 1g/L sulfato de amônio; 2 mg/L sulfato de magnésio heptahidratado; 50 mg/L cloreto de cálcio dihidratado) e incubadas em orbital sob agitação de 250 rpm a 30 °C, na ausência de luz, por um período de 3 a 4 dias. Após o tempo de crescimento em meio líquido, foi realizado o procedimento de lise alcalina e também uma precipitação do meio extracelular, para a confirmar a presença do pDNA no ambiente intra ou extracelular. Para a lise alcalina, realizou-se um procedimento com recurso a um Kit comercial com mini-prep, seguindo as recomendações do fabricante (NZYminiprep-MB010) Para a verificação da presença de ácidos nucleicos no meio extracelular, 2 mL do meio de cultura foram centrifugados por 10 min, a 11000 g, a 4 °C, seguido da transferência de 1mL do sobrenadante para outro tubo e adição do mesmo volume de isopropanol. A solução foi colocada a -20 °C por 4 horas, para ocorrer a precipitação. Após esse período, o tubo foi centrifugado durante 20 min a 16000 g, seguido do descarte do sobrenadante. O precipitado foi então lavado com 1500 µL de ETOH 70%, sendo o pellet ressuspendido em 50 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.

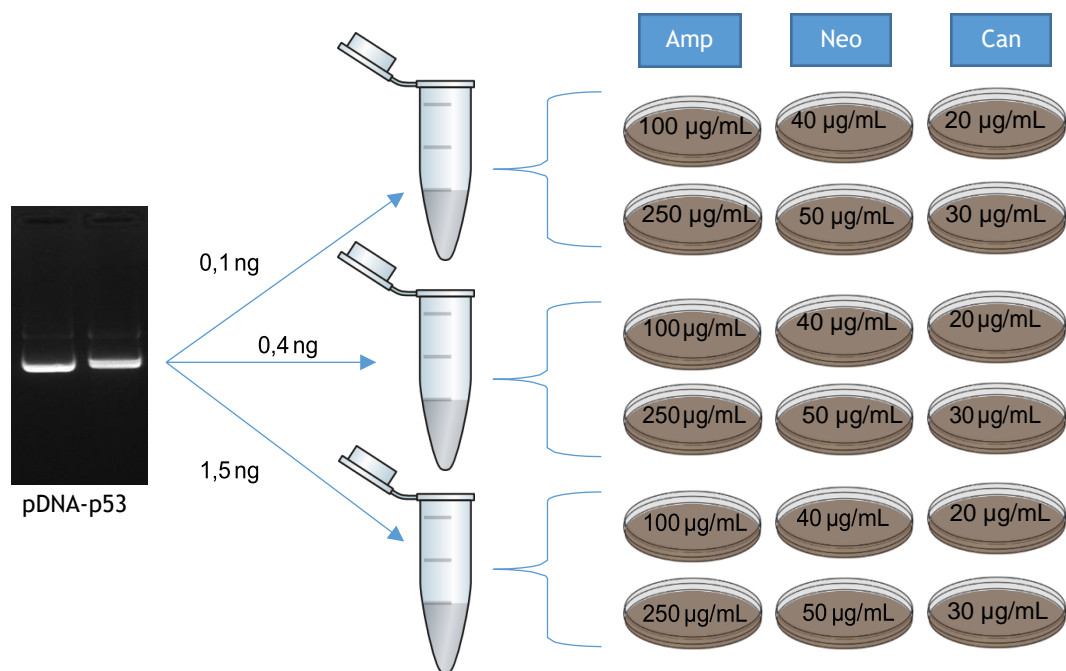


Figura 11: Detalhes dos ensaios preliminares para transformar *Rhodovulum sulfidophilum*. Gel de eletroforese à esquerda, mostrando duas bandas do pDNA-p53 extraídos do miniprep para uso na transformação. Três diferentes massas do plasmídeo foram usadas para três tubos de células termocompetentes de *R. sulfidophilum*. As placas de petri, representam o meio sólido com três diferentes antibióticos (amp.; neo.; can) e as respectivas concentrações usadas para o crescimento da bactéria.

3.1.2 *Escherichia coli*

Para a cultura celular de *E. coli* contendo o pcDNA3 flag p53, utilizou-se como meio sólido o meio Luria Bertani (LB) contendo agar, suplementado com ampicilina (30 µg/mL), onde as células foram plaqueadas a partir de um banco de células criopreservadas, sendo posteriormente incubadas a 37 °C *overnight* para o crescimento. Após o crescimento em meio sólido, as células foram transferidas para meio líquido Terrific Broth (20 g/L de triptona; 24 g/L de extrato de levedura; 4 mL/L de glicerol; 0,017 M KH₂PO₄; 0,072 M K₂HPO₄) com 30 µg/mL de ampicilina, para uma pré-fermentação, sob agitação de 250 rpm, a 37 °C, até atingir a densidade ótica de aproximadamente 2,6 e posteriormente, as células foram transferidas para outro *erlenmeyer* contendo 250 mL do mesmo meio líquido Terrific Broth e incubadas sob agitação de 250 rpm, a 37 °C, por um período aproximado de 10 a 11 horas. A fermentação foi iniciada a partir da pré-fermentação, com uma densidade ótica de 0,2. O volume exato a retirar da pré-fermentação foi determinado através da seguinte expressão:

$$\text{Vol. pré-fermentação} = \frac{\text{V. Fermentação} \times 0,2}{\text{D.O pré fermentação} - 0,2}$$

Com base no resultado dessa expressão, iniciava-se a fermentação que geralmente atingia a densidade ótica (medida a 600 nm) aproximada de 9. Finalizada a etapa de fermentação, a massa celular é recuperada por centrifugação a 3900 g, durante 15 min, a 4 °C.

3.2 Lise alcalina modificada

A massa celular foi ressuspensa em 10 mL de solução de ressuspensão (50 mM glucose; 25 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA) pH 8,0. De seguida, a lise ocorreu pela adição de 10 mL de solução de lise (200 mM NaOH; 1 % SDS) e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 10 mL de solução de neutralização (3 M acetato de potássio, pH 5,0 pré-arrefecido), sendo o extrato colocado em gelo durante 20 minutos. Após este período de incubação, o lisado foi centrifugado a 20000 g, durante 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e adicionaram-se 0,7 volumes de isopropanol, sendo a mistura colocada em gelo por 30 minutos, para a precipitação de ácidos nucleicos. Uma nova centrifugação a 16000 g foi realizada durante 30 minutos a 4°C, para recuperação do precipitado. O precipitado foi posteriormente ressuspensa em 1 mL de tampão, que depende da estratégia de purificação a realizar, sendo esta ressuspensão realizada em 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 quando destinado à purificação em Histidina-Sepharose ou em Arginina-Macroporosa e realizada em Citrato de Sódio [10 mM ácido cítrico; 10 mM citrato de sódio; 10 mM EDTA] pH 5,0), quando destinado à purificação através do monolito de histidina. Após esta ressuspensão, foi adicionado sulfato de amónio em sal para perfazer uma concentração de 2,5 M. A mistura foi sujeita a uma incubação em gelo por 15 minutos, após a qual foi realizada uma centrifugação a 17000 g, durante 30 Minutos a 4 °C, seguido da recuperação do sobrenadante.

3.3 Purificação por Cromatografia de Afinidade

Os ensaios de cromatografia preparativa foram realizados no sistema AKTA Purifier com o software UNICORN™ versão 5.11 (GE Healthcare Biosciences Uppsala, Suécia) com o objetivo de purificar maioritariamente a isoforma sc do p53-pDNA. Os procedimentos de purificação foram realizados em três matrizes cromatográficas usando diferentes aminoácidos e suportes, nomeadamente a Histidina-Sepharose; Arginina-Macroporosa e Histidina-Monolito, conforme descrito abaixo.

3.3.1 Histidina-Sepharose

Uma coluna de 16 mm de diâmetro x 30 mm foi empacotada com aproximadamente 6 mL de L-Histidina sepharose. A coluna foi equilibrada com 2,3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 a um caudal de 1 mL/min. Após o equilíbrio da coluna, foi feita a injeção do lisado parcialmente purificado usando um *loop* de 200 μL . Para a eluição diferencial das espécies retidas foi aplicado um gradiente decrescente de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, realizando dois passos com 1,7 M e 0 M de sal em tampão Tris-HCl. Durante os ensaios cromatográficos, as

soluções da fase móvel foram mantidas em gelo e a temperatura da coluna foi estabelecida a 4 °C, recorrendo à programação de um banho termostático. As espécies referentes aos três picos gerados foram recuperadas para uma posterior dessalinização e concentração em Vivaspin Concentrators (Vivascience).

3.3.2 Arginina-Macroporosa

Antes da injeção da amostra, o lisado clarificado foi submetido a uma dessalinização, o que foi feito pela coluna PD-10. O processo consistiu no equilíbrio da coluna com 5 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, repetindo a etapa por 5 vezes, seguido da adição de 1 mL da amostra de lisado. Posteriormente, a coluna é sujeita à aplicação de 5 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e as frações são recuperadas para posterior análise em eletroforese, para confirmar a eluição da amostra. Para a purificação, uma coluna de 10 mm de diâmetro x 20 mm foi empacotada com aproximadamente 1,6 mL de Arginina imobilizada em suporte macroporoso. A coluna foi equilibrada com 96 mM de NaCl em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 a um caudal de 1 mL/min. Após o equilíbrio, foi feita a aplicação do lisado clarificado e dessalinizado, usando um *loop* de 100 µL. Para a eluição diferencial das espécies retidas foi aplicado um gradiente crescente de concentração de NaCl, realizando dois passos com 500 mM e 2 M de sal em tampão Tris-HCl. Durante os ensaios cromatográficos, as soluções da fase móvel foram mantidas a 10 °C e a temperatura da coluna foi estabelecida e controlada a 5 °C. As espécies referentes aos três picos gerados foram recuperadas para uma posterior dessalinização e concentração em Vivaspin Concentrators (Vivascience).

3.3.3 Histidina-Monolito

A coluna CIMacTM L-histidina foi também usada como matriz para avaliação do efeito do suporte na purificação do plasmídeo de interesse. Neste caso, a coluna foi inicialmente equilibrada com 3 M de (NH₄)₂SO₄ em tampão Citrato de Sódio (10 mM ácido cítrico; 10 mM citrato de sódio; 10 mM EDTA) pH 5,0 a um caudal de 1 mL/min. A amostra foi então aplicada em um *loop* de 100 µL. Para a eluição diferencial das espécies retidas foi aplicado um gradiente decrescente de concentração de (NH₄)₂SO₄, realizando dois passos com 2,52 M e 0 M de sal em tampão Citrato de Sódio. Durante os ensaios cromatográficos, as soluções da fase móvel foram mantidas em gelo. As espécies referentes aos três picos gerados foram recuperadas para uma posterior dessalinização e concentração em Vivaspin Concentrators (Vivascience).

3.4 Análise de pureza do pDNA purificado

O grau de pureza da isoforma superenrolada, purificada nas três matrizes descritas acima, foi avaliado por diversos métodos analíticos, uma vez que o plasmídeo purificado precisa cumprir as exigências das agências reguladoras, FDA e EMA.

3.4.1 Avaliação por cromatografia analítica

A pureza e rendimento de recuperação do sc p53-pDNA foram avaliados com base na cromatografia de troca iônica, utilizando o suporte monolítico comercial CIMac (BIA Separations) com recurso a um método analítico previamente estabelecido [132]. Brevemente, este método consiste na construção de uma curva de calibração usando padrões de sc pDNA, com concentrações no intervalo de 1-25 µg/mL. As amostras foram diluídas em 200 mM Tris-HCl (pH 8,0) e em seguida a concentração foi verificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer-Pharmacia Biotech, Cambridge, England). A coluna analítica foi equilibrada com 600 mM NaCl em Tris-HCl 200 mM (pH 8,0) e 20 µL da amostra foi injetada. Posteriormente o gradiente foi estabelecido para 700 mM NaCl em 200 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0). Para a determinação do rendimento de recuperação do sc pDNA foi realizada a comparação da quantidade de pDNA na amostra purificada com a quantidade preexistente no lisado inicial, através da quantificação da área do pico correspondente ao sc pDNA. A pureza da amostra foi determinada pela razão entre a área do pico do sc pDNA e a área total correspondente a todos os picos presentes no cromatograma.

3.4.2 Quantificação de proteínas

Para avaliar a presença de proteínas na amostra purificada de p53-pDNA foi usado o método do ácido bicinonínico (BCA) [133], usando o Kit micro-BCA (Rockford, IL, USA). Este método colorimétrico baseia-se na reação de biureto, já que em caso de presença de proteína, o Cu^{2+} é reduzido a Cu^+ , em meio alcalino. Nesse caso uma cor violeta pode ser observada com intensidade proporcional à concentração de proteína presente. A quantificação pode ser feita no espectrofotômetro com leitura da absorvância a 562 nm. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, sendo realizada uma curva de calibração com padrões de albumina sérica bovina - BSA, no intervalo de concentrações de 0,01-0,1 mg/mL, preparados em Tris-HCl 10 mM pH 8,0 ou Citrato de Sódio 10 mM +10 mM EDTA pH 5,0, dependendo do tampão usado na preparação do lisado e purificação do sc pDNA.

3.4.3 Quantificação de DNA genómico

Para detecção e quantificação de gDNA nas amostras de pDNA purificadas, foi realizado o método de *Real time Polymerase Chain Reaction* (PCR), no sistema iQ5 Multicolor real-time PCR (Bio-Rad), como descrito anteriormente [111]. Os primers sense (5'-ACACGGTCCA GAACTCCTACG-3') e antisense (5'-CCGGTGCTTCTTCTGCGGGT AACGTCA-3') foram usados para amplificar uma região de 181 pb do gene condificador do rRNA 16S. Para a quantificação do gDNA presente na amostra de lisado, foi feito uma diluição 100 vezes. Os produtos da amplificação foram quantificados observando alterações na fluorescência do corante de ligação ao DNA, neste caso o Syber Green (Bio-Rad). Para a medida da concentração do gDNA obtido, uma curva de calibração foi feita através de diluições consecutivas de gDNA purificado de *E-*

coli DH5 α , de 0,005 a 50 ng/ μ L. O controlo negativo, não contendo amostra de gDNA, foi preparado em paralelo.

3.4.4 Quantificação de Endotoxinas

A determinação da quantidade de endotoxinas presente nas amostras foi realizada através do kit ToxiSensor cromogénico *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) (GenScript, USA) seguindo as instruções do fabricante. O método baseia-se no facto de uma proteína presente na hemolinfa de um caranguejo (*Limulus polyphemus*) reagir com endotoxinas provenientes da célula hospedeira de *E. coli* DH5 α , produzindo uma coloração amarela que pode ser medida a 405 nm [134]. Para a determinação dos níveis de endotoxinas, foi preparada uma curva de calibração (0,1 a 1 EU/mL) a partir de uma solução padrão de 8 EU/mL, fornecida pelo fabricante. O ensaio foi realizado em condições assépticas, usando a água livre de endotoxinas, disponibilizada pelo fabricante, necessária para a diluição das amostras que também serviu como branco, evitando assim a interferência de endotoxinas externas.

3.5 Análise Estrutural pDNA

3.5.1 Dicroísmo Circular

A investigação por dicroísmo circular é altamente sensível e baseia-se na absorção de luz, por biopolímeros em solução, sendo que quando um feixe de luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda é absorvido de formas diferentes por uma dada molécula, um espectro de comprimento de onda é gerado variando de acordo com a rotação da molécula analisada [135], o que possibilita uma compreensão sobre a topologia do analito, neste caso, o sc pDNA. No presente trabalho, o dicroísmo circular foi utilizado para avaliar a estabilidade conformacional das moléculas de sc pDNA, após o processo de extração e purificação, quando sujeitas a diferentes condições, tais como, uso de diferentes tampões/sais, bem como pH, que podem influenciar a estrutura da dupla-hélice do DNA. O equipamento utilizado foi o Jasco J-1850 Spectrophotometer (Jasco, Easton, MD, EUA) e uma célula de quartzo retangular (Hellman analysis, Alemanha) com um percurso ótico de 1 mm. Os espectros foram obtidos a uma velocidade de varrimento de 10 nm/min, com uma gama de absorvância entre 320-210 nm e a uma largura de banda espectral de 1 nm. O volume de amostra analisada foi de 400 μ L e a concentração das amostras de DNA plasmídico (100 μ g/mL), foram calculadas após a quantificação no Nanodrop. Todos os ensaios foram então realizados sob um fluxo constante de azoto, para purgar o ozono que é gerado pela fonte de luz (lâmpada de xénon) do equipamento. Para todas as amostras analisadas, foi efetuado um branco (apenas tampão sem DNA plasmídico), que foi posteriormente subtraído em todas as corridas da amostra. Os dados foram recolhidos em triplicado (n=3) e as médias representadas num único espectro. No final de cada corrida, é retirado o ruído usando o Software Jasco J1850, para se obter um espectro mais linear sem distorção das bandas positivas (275 e 220 nm) e negativa (245 nm) características do DNA plasmídico, e o sinal DC é mostrado em elipiticidade.

3.5.2 Potencial Zeta

A carga superficial das amostras foi determinada através da medição do seu potencial zeta usando o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) em células capilares descartáveis, a 25 °C. O valor do potencial zeta foi calculado através dos modelos de Henry [F(Ka)^{1,5}] e Smoluchowsky. Os valores médios das medidas de potencial zeta foram calculados com os dados obtidos a partir de três repetições ± DP.

3.6 Avaliação Bioatividade

A bioatividade do sc p53-pDNA foi avaliada por determinação da expressão génica e expressão proteica da p53 codificada pelo plasmídeo usado, recorrendo à transfeção das linhas celulares de células de cancro cervical (HeLa) e células de fibroblastos dérmicos humanos (hFib), de acordo com as condições descritas de seguida.

3.6.1 Cultura celular e transfeção

As linhas celulares, HeLa e hFIB, foram cultivadas em meio DMEM-F12, suplementadas com FBS 10% v/v, ativado termicamente, e estreptomina (100 µg/mL) a 37°C, sob atmosfera humidificada a 5% de CO₂. As células foram então semeadas em frascos até atingirem a confluência. Depois as células foram tripsinizadas com 0,18% de tripsina (1:250) com 5 mM EDTA. Os ensaios de transfeção foram realizados semeando 1x10⁴ células numa placa de 96 poços com 200 µL de meio DMEM-F12 completo e incubado por 24 horas. Depois disso, o meio completo foi substituído por meio sem FBS e sem antibiótico, para promover a transfeção. Os ensaios de transfeção foram então realizados com reagente comercial disponível, Lipofectamine 2000 (LP 2000), onde em cada poço foram adicionados 0,28 µL de LP 2000 + 0,14 µg de pDNA em 5,15 µL de meio Opti-MEM[®] 1, de acordo com o protocolo do fornecedor. Antes da reação de complexação, LP 2000 foi incubado à temperatura ambiente. Os complexos LP 2000-pDNA foram incubados junto as células por um período de 6 horas e depois desse prazo o meio foi trocado para meio DMEM-F12 completo.

3.6.2 Citotoxicidade

Dois dias após a transfeção, para avaliar se as formulações (complexo LP2000-pDNA) apresentaram algum efeito de toxicidade nas células, foi realizado um ensaio com resazurina. Para tal, 10 µL de resazurina 2,5 mM foram adicionados a cada poço e incubados por 4 h, a 37°C, em atmosfera com humidade a 5% de CO₂, na ausência de luz. O mesmo procedimento foi executado para as duas linhas celulares acima mencionadas. Para além do ensaio de transfeção com as amostras de sc pDNA purificadas, foram também realizadas transfeções com amostras de DNA nativo (sc+oc). Como controlo negativo foram usadas células não transfetadas, e o controlo positivo foi preparado com incubação das células com ETOH. Após este processo, o produto resultante, nomeadamente resofurina foi quantificado utilizando um leitor de placas (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices LLC, EUA), a um comprimento de onda de excitação

/ emissão de λ_{ex} = 560 nm e λ_{em} = 590 nm. Os dados representam a média de três ensaios independentes.

3.6.3 Avaliação da expressão da proteína p53 por ELISA

O kit ELISA p53 (Enzo Life Sciences) foi usado para quantificar os níveis da proteína P53 após transfeção de células com o vetor p53-pDNA. Resumidamente, 48 horas após transfeção com os complexos LP2000-pDNA, as células HeLa e hFib foram lavadas com PBS gelado e homogeneizadas em tampão de lise celular: tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,4; EDTA 2,5 mM; 1% de Triton X-100; 2,5 mM de EGTA; Fluoreto de fenilmetilsulfonilo 25 mM e cocktail inibidor de protease completo isento de EDTA (Roche). Os extractos celulares foram então centrifugados a 11500 rpm durante 7 min a 4 °C e o sobrenadante foi analisado utilizando o método de Bradford para quantificação de proteína (BioRad) de acordo com as instruções do fornecedor. Em seguida, o protocolo fornecido pela Enzo life Sciences para o método ELISA foi aplicado e a expressão da proteína P53 foi finalmente medida em um espectrofotômetro de placa (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices LLC, EUA), avaliando a absorvância a 450 nm. Os dados representam a média de duas experiências independentes.

3.6.4 Avaliação Apoptose

Após 48 horas da realização da transfeção das células HeLa com as amostras de sc pDNA purificadas através da cromatografia, a apoptose mediada pela p53 foi determinada. Como controlo negativo (k-), foram usadas e avaliadas células HeLa não transfetadas com o plasmídeo terapêutico. A taxa de apoptose nas células foi medida usando o Kit HT TiterTACS™ Assay Kit, seguindo as instruções do fabricante. Esse método, que emprega a detecção colorimétrica *in situ*, foi projetado especificamente para avaliação da apoptose em cultura de células em suspensão e mono camadas. O ensaio detecta nucleotídeos biotinilados inseridos pela enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) nas extremidades do DNA previamente fragmentado pela apoptose celular. A esses nucleotídeos biotinilados, liga-se a proteína estreptavidina conjugada a enzima HRP, que na presença do substrato Tacs Sapphire, induz a emissão de luz que é quantificada a 450 nm. Esse experimento foi realizado em condições asépticas.

3.6.5 Análises estatísticas

Cada experiência foi realizada pelo menos duas ou três vezes. Os dados são expressos como uma média \pm erro padrão (S.D.). A análise estatística realizada foi análise de variância one-way (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla Turkey. Um valor de p abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A análise dos dados e os testes estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism 6.

Capítulo 4

4 Resultados e Discussão

4.1 Biossíntese e recuperação do plasmídeo pc flag p53

O sucesso da terapia génica está dependente da obtenção de elevadas concentrações do plasmídeo terapêutico, já que frequentemente a expressão do gene exógeno nas células transfetadas é transiente. Considerando esta necessidade, é essencial realizar uma etapa de produção que permita a obtenção de múltiplas cópias do plasmídeo alvo, podendo igualmente ser desenvolvido um processo mais rápido e economicamente mais vantajoso. A biossíntese do plasmídeo ocorre no interior de células hospedeiras, geralmente em *Escherichia coli*, que quando colocadas em meio de cultura adequado, se multiplicam, replicando também o plasmídeo no citoplasma, que posteriormente é extraído da célula. Neste trabalho, e para a produção do pDNA, além da utilização de *E. coli* como bactéria hospedeira, um estudo preliminar em outra espécie bacteriana, nomeadamente *Rhodovulum sulfidophilum*, também foi executado conforme detalhado a seguir.

4.1.1 *Rhodovulum sulfidophilum*-Estudos preliminares

A característica intrínseca desta bactéria em secretar ácidos nucleicos para o meio extracelular motivou a realização de várias tentativas para promover a sua transformação com o p53-pDNA, uma vez que isso poderia possibilitar a exclusão de uma etapa de lise alcalina, reduzindo tempo de trabalho, custos, e evitando o uso dos agentes alcalinos na extração, o que facilitaria a recuperação da molécula de uma forma mais intacta e estável para posterior aplicação. Na tentativa de obter clones recombinantes de *R. sulfidophilum*, foi inicialmente avaliada a possibilidade de usar concentrações elevadas de ampicilina, já que uma análise *in silico* mostrou que *R. sulfidophilum* possui um gene que codifica para a enzima β -Lactamase (NHU_03651), que degrada antibióticos da classe dos β -lactâmicos como ampicilina, conferindo resistência à célula hospedeira. Também em paralelo foi estudada a utilização dos antibióticos canamicina e neomicina, na tentativa de selecionar um antibiótico para o qual o hospedeiro não apresentasse resistência natural. Esta seleção pareceu razoável, uma vez que o pDNA-p53 também confere resistência a estes antibióticos. Diferentemente da ampicilina, a canamicina e neomicina pertencem à classe dos antibióticos aminoglicosídeos, e nesse caso, não seriam degradados pela β -Lactamase. Assim, após o procedimento de transformação da *R. sulfidophilum* DSM 1374, as células cresceram em meio sólido, mostrando-se resistentes aos três antibióticos testados (amp.; neo.; can.), não sendo sensíveis a nenhuma das concentrações às quais foram expostas. Este resultado seria esperado, já que as células poderiam ter sido modificadas com o pDNA-p53. No entanto, verificou-se que o crescimento também ocorreu para as bactérias não transformadas (grupo controlo), e neste caso a resistência não seria expectável, pelo facto de as células não terem incorporado o pDNA, a não ser que as próprias células apresentassem uma resistência natural aos antibióticos em estudo. Após esse crescimento, as células ainda foram transferidas para meio líquido também contendo os antibióticos (amp.; neo.; can.) para realização de mini prep, na tentativa de extrair e identificar a presença do plasmídeo de interesse. A figura 12 mostra o crescimento das colónias em meio sólido contendo antibiótico ampicilina (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com o respetivo crescimento em meio líquido suplementado com o mesmo antibiótico.

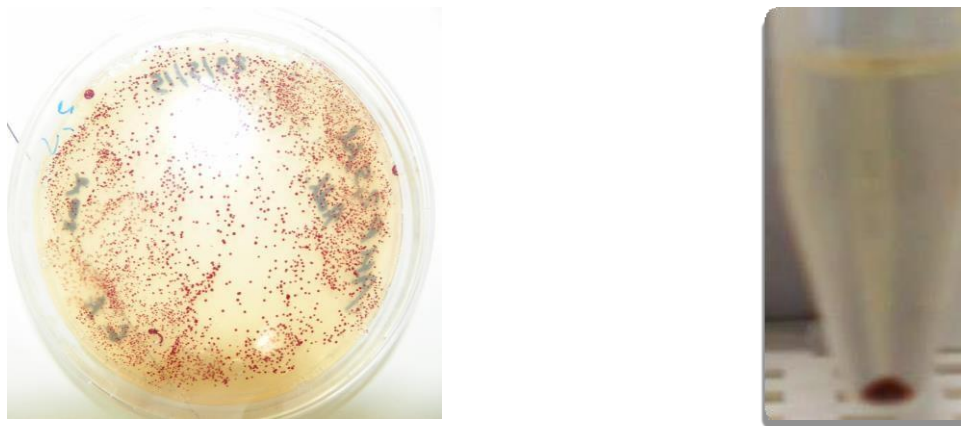


Figura 12: A) Placa com colónias de *Rhodovulum sulfidophilum* após 5 dias de incubação em meio sólido com ampicilina (250 µg/mL). B) Crescimento em meio líquido contendo ampicilina (250 µg/mL), após a recuperação da massa celular por centrifugação.

Após o crescimento em meio líquido foi recuperado o sobrenadante e as células, para avaliar a possível acumulação do plasmídeo intra ou extracelularmente, considerando as características da bactéria. Assim, as células foram submetidas ao procedimento de lise alcalina, e o sobrenadante foi sujeito a precipitação. Após a precipitação do meio extracelular, foram visualizadas algumas bandas na eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 13A), que não foram identificados imediatamente. Para tentar identificar as biomoléculas presentes na electroforese, foram realizados vários testes, já que a banda poderia corresponder a alguma topologia do plasmídeo. Assim, foi realizado um ensaio decisivo com uma enzima de restrição, a APAI, que cliva o plasmídeo p53 em regiões específicas (5' ...GGGCC~C...3') (figura 13 B).

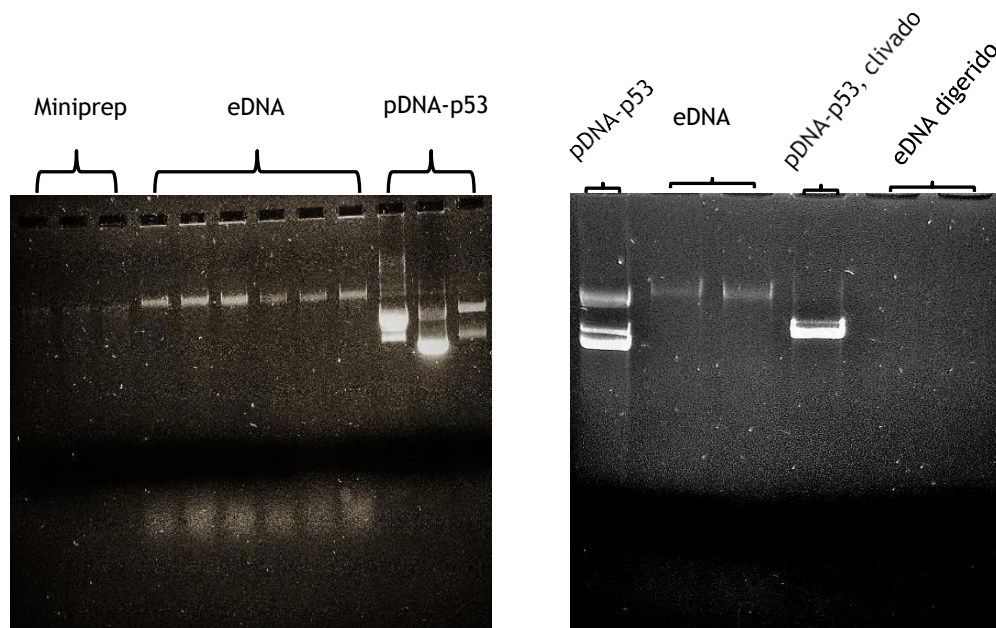


Figura 13: Gel de eletroforese 0,8% de agarose, mostrando possíveis bandas de pDNA extraídas de *R. sulfidophilum*. A) extração do pDNA, por miniprep e do meio extracelular, precipitado com isopropanol e pDNA-p53 extraído de *E. coli*, como referência. B) clivagem por enzima APAI da banda precipitada do meio líquido de *R. sulfidophilum*

Após a clivagem, o plasmídeo deveria ser linearizado, mas o que foi observado foi a ausência de qualquer banda, o que poderia ser devido à digestão ou degradação completa da espécie em causa. Este resultado também demonstrou que a banda não correspondia à molécula alvo, sendo que os ensaios de digestão enzimática foram então decisivos para demonstrar que o plasmídeo não foi replicado na bactéria como seria desejável. Para compreender este fenómeno, foi realizada alguma pesquisa bibliográfica que revelou que alguns membros das alphaproteobactérias, incluindo *R. sulfidophilum*, são capazes de produzir partículas que têm função na transferência horizontal de genes, nomeadamente *Gene transfer agents* (GTAs) [136, 137], sendo uma possível explicação para a espécie encontrada no meio de cultura precipitado. A literatura também reporta que esta bactéria possui uma composição genética muito complexa que se constitui, além do cromossoma, por outros dois plasmídeos residentes [138] que podem eliminar por competição, um terceiro plasmídeo exógeno. No que se refere à instabilidade plasmidial, verifica-se que a carga metabólica provocada na célula hospedeira, pode ocorrer tanto pela replicação como pela expressão de genes do plasmídeo no interior da célula, e em ambos os casos podem conduzir à eliminação da molécula pela célula [139]. Relativamente à resistência aos antibióticos que foi verificada, concluiu-se que não estava relacionada com a transformação com o plasmídeo de interesse, já que as células não transformadas também adquiriram resistência. Os três antibióticos usados, poderão ter sido de alguma forma inativados pela bactéria e independente de genes que confirmam a resistência, a literatura tem reportado outros mecanismos de defesa aos aminoglicosídeos, garantindo a resistência das células. Dentre

esses mecanismos de resistência, bombas de efluxo, bem como outros mecanismos que modificam a droga inativando-a, são os mais frequentes [140]. Também, a capacidade da *R. sulfidophilum* em formar biofilmes, explica o crescimento das células em culturas com antibiótico [141].

Devido as complexas características dessa bactéria citadas acima e as dificuldades em transformá-la com o plasmídeo de interesse, foi tomada a decisão de avançar com este projeto utilizando uma bactéria também prevista para uso nesse trabalho, a *Escherichia coli*.

4.1.2 *Escherichia coli*

A utilização de uma bactéria de simples e rápido crescimento e com necessidades nutricionais e metabolismo bem conhecidos, como a *Escherichia coli*, representa uma ferramenta muito útil em processos biotecnológicos. Assim sendo, estas células transformadas com o plasmídeo de interesse foram usadas para a biossíntese do plasmídeo, através de fermentação. As células cresceram em meio de cultura adequado até atingir a densidade ótica (a 600 nm) necessária, aproximadamente 9, garantindo assim quantidades adequadas de plasmídeos que foram extraídos por lise alcalina modificada, figura 14.

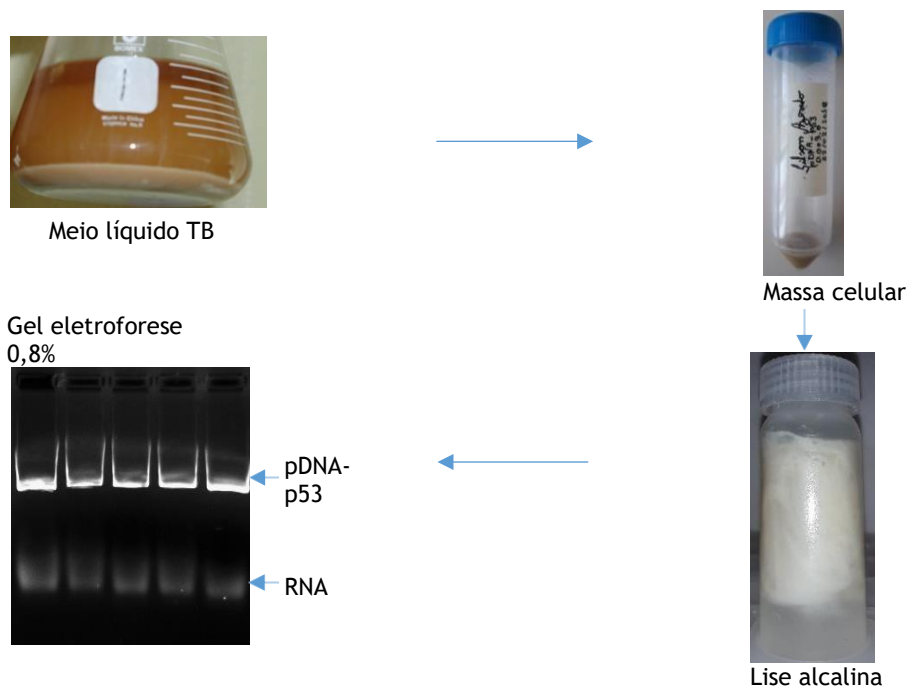


Figura 14: Esquema que representa o processo desde a biossíntese, recuperação celular, lise alcalina e o gel de agarose 0,8%, mostrando o pDNA extraído

As etapas vistas até aqui marcam então o ciclo *upstream* e como detalhado a seguir, inicia-se o ciclo *downstream*, representados pelas etapas de purificação cromatográfica.

4.2 Cromatografia de afinidade para purificação de p53-pDNA

Após a produção do p53-pDNA em células de *E. coli* seguida da extração do plasmídeo por lise alcalina, o lisado clarificado foi submetido ao processo de purificação cromatográfica, usando os suportes de histidina-Sepharose, arginina-macroporosa e histidina-monolito. O uso dos aminoácidos histidina e arginina como ligandos para a purificação de ácidos nucleicos tem sido muito estudado, tendo sido já demonstrada a eficácia de recuperação de outros tipos de plasmídeos com alto grau de pureza [111, 112, 121]. Embora múltiplas interações não covalentes ocorram entre o plasmídeo e os aminoácidos como ligandos, a literatura reporta que o comportamento de ligação da arginina é maioritariamente iônico, enquanto que a histidina é maioritariamente hidrofóbico, variando também em conformidade com as condições de ligação/eluição usadas. A escolha destes aminoácidos nesse estudo, se deve a essa diferença de comportamento uma vez que o objetivo principal do trabalho é a avaliação de possíveis influências destes parâmetros cromatográficos na molécula de pDNA, quer ao nível da sua estabilidade quer da sua atividade. Após cada estratégia de purificação foi avaliado o grau de pureza e recuperação da molécula alvo (sc pDNA), para garantir se a eliminação das impurezas do lisado permite a obtenção do produto de pDNA em concordância com os critérios e limites estabelecidos pelas agências reguladoras. Para definir o valor exato da pureza e recuperação da molécula alvo, foi então gerado um cromatograma padrão, apenas com o tampão na concentração de 600 mM NaCl em 200 mM de tampão Tris-HCl, seguido do aumento do gradiente para 700 mM NaCl em 200 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0). A figura 15 representa o cromatograma gerado pela injeção de 200 mM de tampão Tris-HCl pH 8,0 (Branco). Esse procedimento foi realizado antes da quantificação das amostras purificadas através das três matrizes cromatográficas, com o objetivo de verificar a interferência acrescida pelo tampão usado nas quantificações.

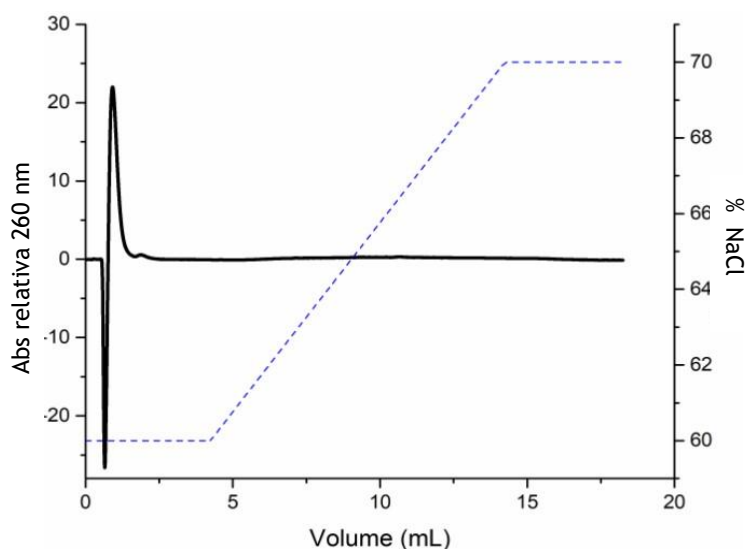


Figura 15: Cromatograma representativo apenas com o tampão (Branco)

Ainda para as análises qualitativas, as amostras purificadas foram analisadas para determinação do conteúdo de impureza, nomeadamente as endotoxinas, gDNA, que devem obedecer aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras (FDA e EMEA). Os resultados são detalhados abaixo.

4.2.1 Purificação de p53-pDNA por cromatografia com Histidina-Sepharose

O aminoácido histidina imobilizado em suporte de agarose, constitui a matriz utilizada nesta etapa cromatográfica. O tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e o tampão salino 3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, diluído em Tris-HCl 10 mM pH 8,0, foram usados como fases móveis para promover a ligação e eluição das biomoléculas que interagem ou não com a matriz. Após o equilíbrio da matriz de histidina a uma concentração de 2,3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, um volume de 200 μL do lisado clarificado foi injetado na coluna usando um caudal de 1 mL/min e ao passar pela matriz, as moléculas com pouca afinidade, que não interagiram com a matriz, acabaram por eluir nessa primeira etapa. Posteriormente, ao reduzir a concentração de sal para 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a molécula alvo (sc pDNA) foi então eluída da matriz e na sequência, a remoção total do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi fundamental para a eluição de todas as espécies que ainda permaneciam adsorvidos à matriz, como o RNA, que constitui um dos principais contaminantes do lisado. O cromatograma e o gel de agarose representativos destes ensaios, são apresentados na figura 16A e 16B, respetivamente.

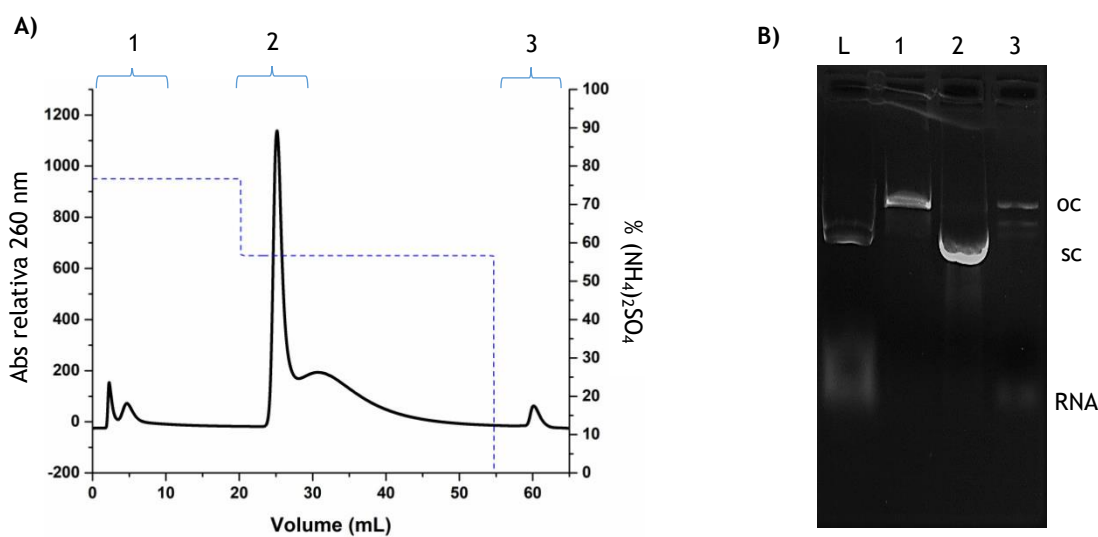


Figura 16: Perfil cromatográfico e análise em gel de agarose de amostras purificadas do lisado clarificado, através da matriz histidina-sepharose . A) Cromatograma de purificação da amostra de lisado, mostrando o gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 76,7%, 56,6% a 0%, com eluição das moléculas mais fortemente ligadas à matriz (picos 1, 2 e 3). b) gel de eletroforese 0,8% mostrando o lisado clarificado (L); Banda referente pDNA circular aberto (1); Banda referente ao pDNA superenrolado (2); Banda referente ao RNA e outras espécies que ainda estavam ligadas a matriz (3).

Polímeros naturais, como a agarose, são amplamente usados em cromatografia líquida e apresentam baixa adsorção inespecífica [142,143], apresentando também uma ligeira hidrofobicidade [102]. Estes suportes são quimicamente estáveis, sendo resistentes a condições extremas de pH e ambientes oxidantes [102]. Quando funcionalizado com o aminoácido histidina (L-histidine-agarose), as interações promovidas são maioritariamente hidrofóbicas, apesar de se estabelecerem outros tipos de interações que conduzem ao bioreconhecimento dos ácidos nucleicos pelo ligando de histidina. Considerando que as bases azotadas são mais expostas na isoforma sc pDNA, devido a configuração dessa isoforma mais compacta e torcida [144] é possível entender o maior tempo de retenção, comparado com oc pDNA que é eluído na primeira etapa. Por outro lado, a natureza do RNA que é uma molécula de cadeia simples, onde as bases azotadas estão mais expostas, permite que as interações se estabeleçam mais facilmente, o que explica o maior tempo de retenção dessa molécula na coluna, quando comparado ao oc e sc pDNA. Adicionalmente, importa considerar que as bases que constituem os ácidos nucleicos apresentam caráter hidrofóbico, conferido pelos anéis aromáticos, por isso é compreensível o facto de que o RNA se ligue mais fortemente à matriz cromatográfica. Estudos anteriores também sugerem que a diminuição da concentração de sal perturba as interações de empilhamento/hidrofóbicas, que é o efeito dominante das interações (pDNA-Histidina) e além dessas interações citadas, pontes de hidrogénio também estão presentes, bem como forças de van der Waals [119,145] e isso explica o porquê da redução da força iónica e a ordem das moléculas eluídas.

A pureza e recuperação do sc pDNA foram avaliadas através da utilização de um método cromatográfico analítico. O cromatograma gerado pela análise quantitativa da amostra de sc pDNA, está representado na figura 17 A e B, que mostram a análise do lisado clarificado (fig. 17 A) e a análise da amostra purificada da isoforma sc pDNA recuperada da etapa de purificação no suporte de histidina-sepharose (fig. 17 B). A partir dessa análise foi possível definir o grau de pureza da isoforma sc pDNA e a taxa de recuperação da amostra, em relação a amostra do lisado inicial. Esses dados são mostrados em percentagem e estão apresentados na tabela 8, bem como os valores analisados das impurezas, com os respectivos valores limites, estabelecidos pelas agências reguladoras.

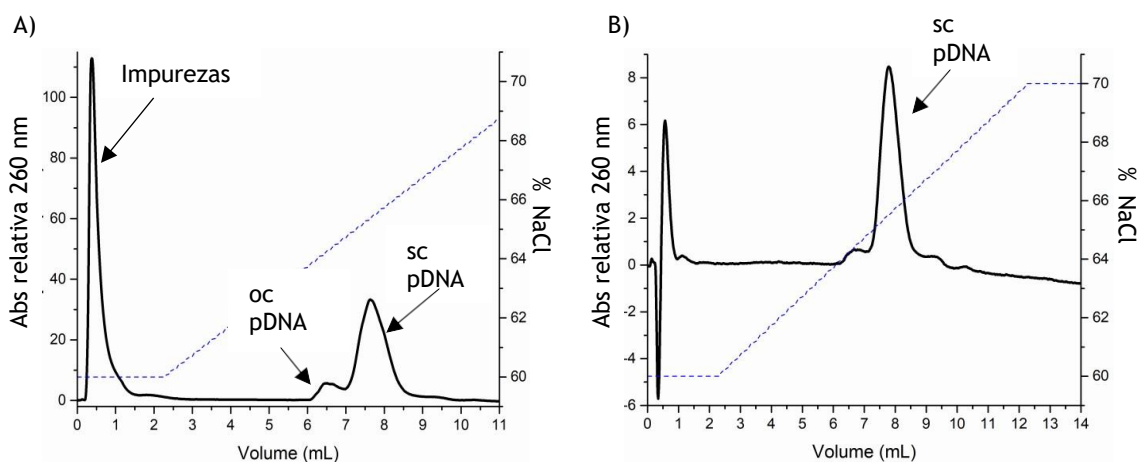


Figura 17: Cromatograma referente a análise quantitativa: (A) Quantificação do pDNA presente no lisado clarificado; (B) Quantificação do sc pDNA purificado através da coluna histidina sepharose.

Tabela 8: Quantificação das impurezas associadas ao sc pDNA purificado por histidina sepharose, comparados aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras

Conteúdo analisado	Valores encontrados	Valores limites
Proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Não detectada	Não detectável
RNA	Não detectado	Não detectável
Endotoxinas ($\text{EU}/\mu\text{g pDNA}$)	0,010	< 0,1 EU/ $\mu\text{g pDNA}$
gDNA ($\mu\text{g}/\mu\text{g de pDNA}$)	0,0008	< 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{g pDNA}$
Pureza	96,84 %	>90%
Recuperação	42 %	----

No que se refere à qualidade, pureza e recuperação da molécula alvo obtida através desta estratégia cromatográfica, com Histidina-Sepharose, verificou-se que ocorreu a purificação seletiva da molécula alvo sendo que o grau de pureza para a isoforma sc pDNA foi de 96,84%, conforme mostrado na tabela 8. Um aspecto interessante, é que esses dados são concordantes com os resultados obtidos previamente para a purificação de um outro plasmídeo (pVAX1-LacZ), onde foi verificado o mesmo valor de pureza da isoforma superenrolada [112], o que comprova a eficácia da metodologia. As impurezas presentes no lisado, como proteínas, RNA, endotoxinas e gDNA foram eliminadas ou reduzidas, mantendo valores abaixo dos limites estabelecido pelas agências reguladoras para produtos terapêuticos. A grande desvantagem do uso dessa matriz histidina-sepharose, é a utilização de altas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que além de tornar o processo cromatográfico mais caro, implica também maior tempo e etapas de manipulação para dessalinização da amostra após a etapa de cromatografia, deixando a molécula mais susceptível ao stress mecânico, podendo comprometer a topologia desejada.

4.2.2 Purificação de p53-pDNA por cromatografia com Arginina-Macroporosa

O aminoácido arginina previamente imobilizado ao suporte macroporoso foi utilizado como ligando nesta estratégia cromatográfica (figura 18).

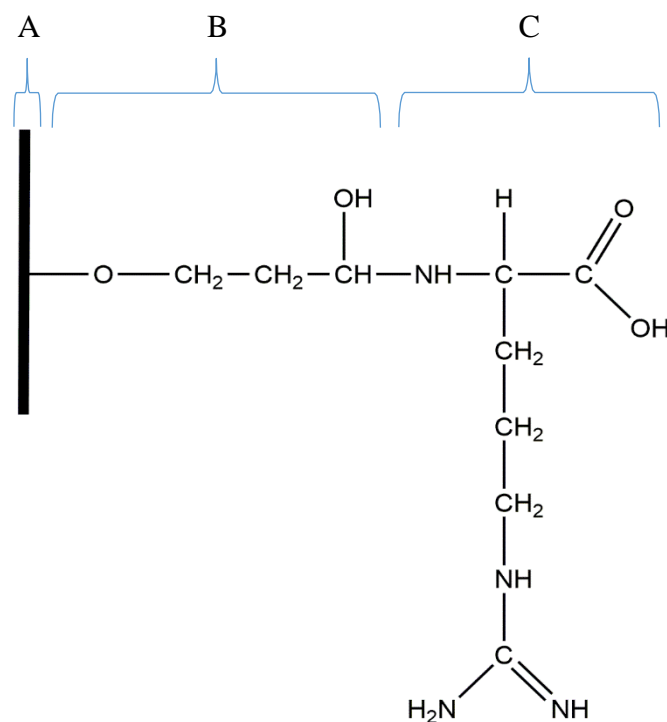


Figura 18: Estrutura química da arginina-macroporosa: A) Suporte macroporoso; B) Braço espaçador; C) Estrutura química arginina

O tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e o sal cloreto de sódio (NaCl 2 M), diluído em Tris-HCl 10 mM pH 8,0, foram usados como fases móveis para promover a ligação e eluição das biomoléculas que interagem ou não com a matriz. Após o equilíbrio da matriz de arginina a uma concentração de 124 mM de NaCl, foi injetado no cromatógrafo um volume de 100 μ L de lisado clarificado, previamente dessalinizado em colunas PD-10, a um caudal de 1 mL/min. Ao passar pela matriz, as moléculas com pouca afinidade, acabaram por eluir nessa primeira etapa. Posteriormente, um aumento da concentração de sal para 500 mM, promoveu a eluição da molécula alvo (sc pDNA). Finalmente, o aumento para a concentração 2 M de NaCl foi fundamental para a remoção de espécies moleculares mais fortemente aderidas a matriz. O cromatograma e o gel de agarose podem ser vistos na figura 19.

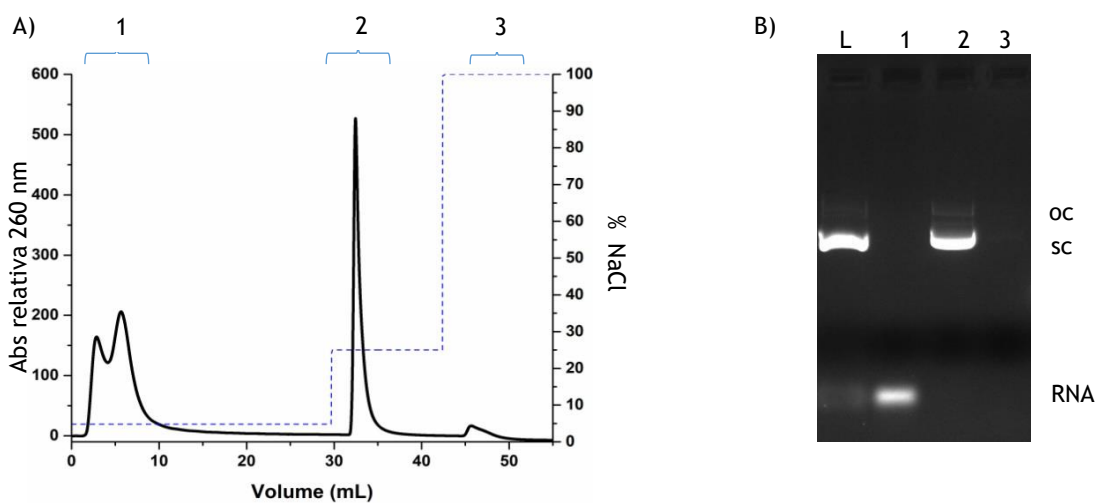


Figura 19: Perfil cromatográfico e análise em gel de agarose de amostras purificadas do lisado clarificado, através da matriz arginina-macroporosa. A) Cromatograma de purificação da amostra de lisado, mostrando o gradiente crescente de NaCl de 6,2%, 25% e 100%, com eluição das moléculas mais fortemente ligadas à matriz arginina-macroporosa (picos 1, 2 e 3). b) gel de eletroforese 0,8% mostrando o lisado clarificado (L); Banda referente ao RNA (1); Banda referente ao pDNA superenrolado (2); Banda referente a eventuais espécies ainda ligadas à matriz cromatográfica (não visíveis no gel) (3)

Diferente do comportamento de interação entre o DNA e os ligandos de histidina, onde as interações eram favorecidas por uma força iónica elevada, neste caso as biomoléculas interagem com a arginina macroporosa a uma baixa força iónica, o que justifica o fato de que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ usado no procedimento de lise, precisar ser removido antes de se injetar a amostra na coluna cromatográfica. Essa dessalinização feita através da coluna PD-10 foi fundamental para que as interações DNA-ligando pudessem ocorrer. A interação do DNA com os ligandos de arginina são maioritariamente eletrostáticas e exploram a natureza polianiónica do DNA contra as cargas positivas do grupo guanidino da arginina, que se encontra protonado a pH 8,0. Ao contrário do observado no comportamento de ligação à histidina, onde as espécies eluíam com a diminuição da concentração de sal, necessária para perturbar as ligações maioritariamente hidrofóbicas, com o ligando de arginina as espécies mais fortemente adsorvidas à matriz eluem

devido ao aumento da força iónica. A carga positiva da arginina, atrai as cargas negativas dos grupos fosfatos da cadeia dos ácidos nucleicos. Com o aumento da concentração de NaCl, aumenta-se também a competição de iões positivos e negativos no interior da coluna que acabam por promover primeiro a eluição de espécies com menor densidade de carga, como é o caso do RNA, que possui apenas uma cadeia simples, pico 1, fig 19 A. Posteriormente, aumentando ainda mais a concentração do sal, é possível eluir moléculas de dupla cadeia, como no caso do pDNA (pico 2, fig. 19 A), assim a ordem de eluição é essencialmente dependente da carga líquida negativa da molécula e da densidade de carga por unidade de superfície [109]. O terceiro pico, pode ser devido a eluição de proteínas que não são detetadas em gel de eletroforese, ou mesmo pequenas quantidades de pDNA circular aberto juntamente com algum RNA. Considerando que a fração de RNA inclui moléculas de tamanho e estrutura muito heterogéneo, podemos considerar que RNAs de tamanhos reduzidos que entraram nos poros do suporte, tenham eluído nessa etapa. De facto, as dimensões dos poros podem influenciar também os comportamentos de ligação, considerando o tamanho das moléculas do lisado. O perfil cromatográfico aqui observado, difere por exemplo, do observado no perfil cromatográfico da purificação do plasmídeo pVAX1-*LacZ* de 6.05-kbp, a partir de lisado clarificado, utilizando a matriz arginina-sepharose. Os autores mostraram uma ordem de eluição onde a isoforma circular aberta elui primeiro, seguido do RNA a uma concentração de 240mM de NaCl e a isoforma superenrolada sai no terceiro pico, a uma concentração de 300 mM [111]. Em outro trabalho, a diferença no perfil cromatográfico foi ainda mais evidente, onde Soares e colaboradores (2013) trabalhando na purificação da isoforma superenrolada do plasmídeo HPV-16 E6/E7, a partir do lisado clarificado, utilizando arginina-monolito, mostraram que nos dois primeiros picos, foram eluídas moléculas de RNA a uma concentração de 600 e 740 mM de NaCl respetivamente e a eluição da isoforma superenrolada do plasmídeo se deu no terceiro pico, a 795 mM de NaCl e um quarto passo onde os autores usaram 1 M de NaCl para eluir outras espécies de RNA [146] que poderiam estar fortemente aderidas a matriz, por exibirem uma estrutura secundária [147]. As diferenças no padrão de eluição das moléculas, podem ser devidas não somente aos diferentes plasmídeos, mas parecem ser mais associadas ao tipo de suporte onde a arginina está imobilizada. Se considerarmos o factor tempo dos ensaios, o monolito representa uma vantagem pois a purificação em arginina-monolito foi feita em 25 minutos, aproximadamente, enquanto que arginina-macroporosa o tempo de ensaio se deu em 55 minutos e arginina-sepharose em aproximadamente 120 minutos.

A pureza e recuperação do sc pDNA foram avaliadas através da utilização de um método cromatográfico analítico. O cromatograma gerado pela análise quantitativa da amostra de sc pDNA, está representado na figura 20 A e B, que mostram a análise do lisado clarificado (fig. 20 A) e a análise da amostra purificada da isoforma sc (fig. 20 B). A partir dessa análise foi possível definir o grau de pureza da isoforma sc pDNA e a percentagem de recuperação da amostra, em relação à amostra do lisado inicial. Esses dados são apresentados na tabela 9, bem

como os valores analisados das impurezas, com os respectivos valores limites, estabelecidos pelas agências reguladoras.

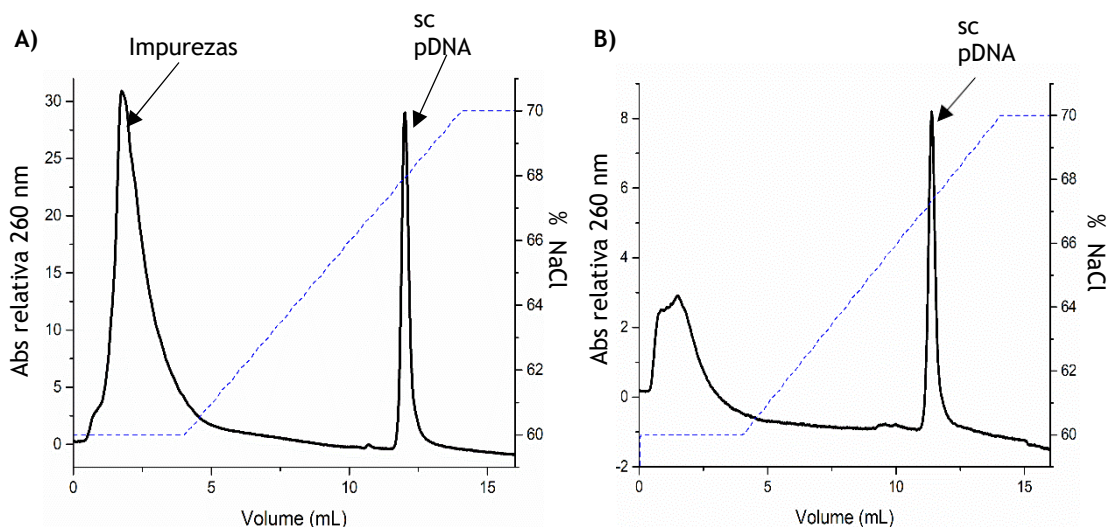


Figura 20: Cromatograma referente a análise quantitativa: (A) Quantificação do pDNA presente no lisado clarificado; (B) Quantificação do sc pDNA purificado através da coluna arginina-macroporosa.

Tabela 9: Quantificação das impurezas associadas ao sc pDNA purificado por arginina macroporosa, comparados aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras

Conteúdo analisado	Valores encontrados	Valores limites
Proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Não detectada	Não detectável
RNA	Não detectado	Não detectável
Endotoxinas ($\text{EU}/\mu\text{g pDNA}$)	0,014	< 0,1 EU/ $\mu\text{g pDNA}$
gDNA ($\mu\text{g}/\mu\text{g pDNA}$)	0,0063	< 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{g pDNA}$
Pureza	92 %	>90%
Recuperação	43 %	----

Apesar do grau de pureza do plasmídeo superenrolado, encontrado neste trabalho ser de 92%, o que está acima dos limites estabelecidos pela FDA, este valor é inferior ao grau de pureza da mesma isoforma encontrada por Sousa e colaboradores (2008), para o plasmídeo (pVAX1-LacZ), onde os autores reportaram um grau de pureza de 100% com um rendimento de recuperação da isoforma sc pDNA de 79% [111]. Soares e colaboradores (2013), também reportaram maior grau de pureza para a sc pDNA recuperado pela arginina-monolito, >99% e um rendimento de recuperação dessa isoforma de aproximadamente 39% [146], pouco abaixo do valor encontrado para p53-pDNA (43 %). Analisando as quantificações das impurezas, indicadas na tabela 9, fica evidente a eficiência da arginina-macroporosa na purificação do pDNA, uma vez que os valores obedecem a todos os requisitos recomendados pela FDA. Esses valores também estão em concordância com os dados encontrados em outros trabalhos que usam a arginina como ligando [111,146].

4.2.3 Purificação de p53-pDNA por cromatografia com Histidina-Monolito

O aminoácido histidina imobilizado em monolito, foi utilizado como ligando nesta estratégia cromatográfica. Para promover a ligação e eluição da amostra, foram criados gradientes recorrendo aos tampões citrato de sódio 10 mM + EDTA 10 mM pH 5,0 e 3M (NH₄)₂SO₄ em citrato de sódio 10 mM + EDTA 10 mM pH 5,0. Cabe salientar que a escolha do tampão citrato de sódio não foi ao acaso, uma vez que esse tampão é estável a pH 5,0. O pH 5,0 mantém o anel imidazol da histidina protonado, uma vez que o seu pKa=6,5. Isso é importante para explorar outras interações, conforme será detalhado mais adiante. Após o equilíbrio da matriz de histidina-monolito a uma concentração de 3 M de (NH₄)₂SO₄, que foi feito para promover uma ligação mais eficiente dos componentes do lisado à matriz, um volume de 100 µL do lisado clarificado foi injetado a um caudal constante de 1 mL/min e ao passar pela matriz, as moléculas sem afinidade que não interagiram com a matriz, acabaram por eluir nessa primeira condição. Posteriormente, ao reduzir a concentração de sal para 2,52 M (NH₄)₂SO₄, o RNA foi eluído da matriz, seguido da purificação da molécula alvo (sc pDNA) com 0 M de (NH₄)₂SO₄. O cromatograma e o gel de agarose podem ser vistos na figura 21.

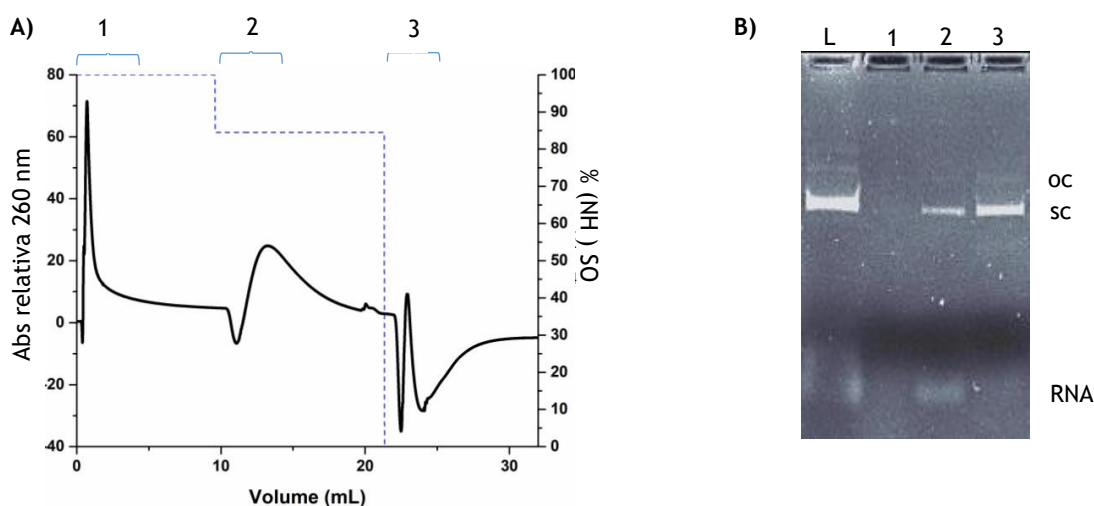


Figura 21: Perfil cromatográfico e análise em gel de agarose de amostras purificadas do lisado clarificado. A) Cromatograma de purificação da amostra de lisado, mostrando o gradiente decrescente de (NH₄)₂SO₄ de 100%, 84% a 0%, com eluição das moléculas mais fortemente ligadas à matriz histidina-monolito (picos 1, 2 e 3). b) gel de eletroforese 0,8% mostrando o lisado clarificado (L); Banda referente a espécies que não se ligaram à matriz (não visualizadas em gel) (1); Banda referente ao RNA + co-eluição sc pDNA (2); Banda referente ao sc pDNA (3).

Nesse caso, apesar de se usar o aminoácido histidina como ligando, é evidente a diferença encontrada nos perfis cromatográficos obtidos nesta estratégia e com o suporte de histidina-sepharose. A diferença nesses padrões poderá estar associada ao tipo de interações exploradas, uma vez que em histidina-sepharose as interações hidrofóbicas são dominantes e no monólito de histidina, para além destas, foram também favorecidas interações eletrostáticas, devido à protonação do anel de imidazol que ocorre a pH 5,0 [121] e esse efeito adicional, acaba por

definir os padrões de eluição que se assemelham com o perfil cromatográfico da arginina-macroporosa. No caso da histidina-monolito, o primeiro passo foi feito usando a concentração máxima de 3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para promover a ligação de todas as moléculas do lisado e ainda assim, um pico inicial foi observado, o que possivelmente poderia ser proteínas ou endotoxinas, uma vez que não foi detetada nenhuma banda em gel de eletroforese. Aqui, a explicação da ordem de eluição, se assemelha ao observado na arginina-macroporosa, onde o RNA elui antes do pDNA e nesse caso, fica claro que as interações eletrostáticas estão presentes, uma vez que o RNA possui apenas uma cadeia fosfato com grupos carregados negativamente, enquanto que o pDNA possui dupla cadeia e portanto, mais grupos negativos estão disponíveis para a interação. A ordem de eluição está também concordante com os dados encontrados por Amorim e colaboradores (2017) que usaram histidina-monolito para purificar o plasmídeo HPV-16 E6/E7 [121].

A pureza e recuperação do sc pDNA foram avaliadas através da utilização de um método cromatográfico analítico. O cromatograma gerado pela análise quantitativa da amostra de sc pDNA, pode ser visto na figura 22 A e B, que mostram a análise do lisado clarificado (fig. 22 A) e a análise da amostra purificada da isoforma sc pDNA (fig. 22 B). A partir dessa análise foi possível determinar o grau de pureza da isoforma sc pDNA e a recuperação da amostra, em relação a amostra do lisado inicial. Esses dados são mostrados em percentagem e estão apresentados na tabela 10, bem como os valores analisados das impurezas, com os respectivos valores limites, estabelecidos pelas agências reguladoras.

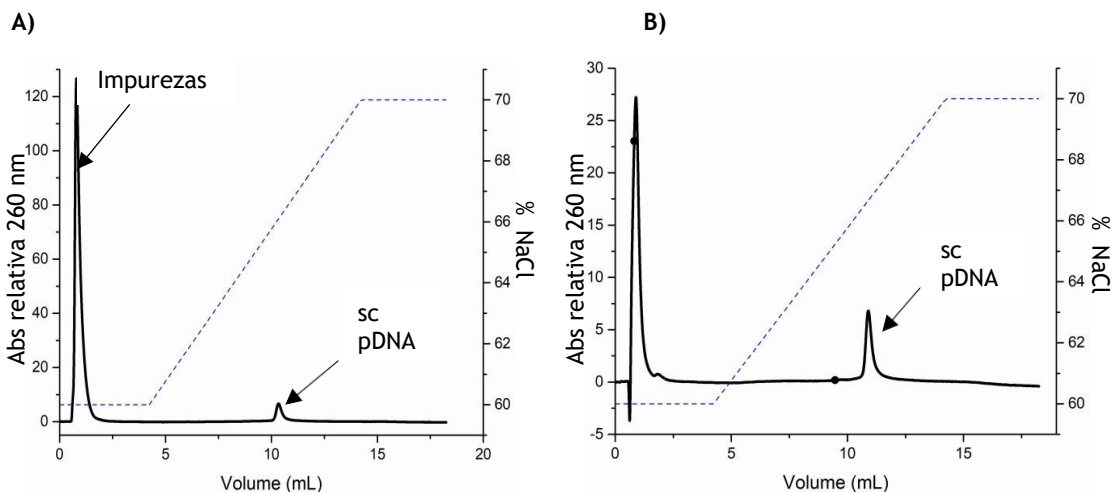


Figura 22: Cromatograma referente a análise quantitativa: (A) Quantificação do pDNA presente no lisado clarificado; (B) Quantificação do sc pDNA purificado através da coluna histidina-monolito.

Tabela 10: Quantificação das impurezas associadas ao sc pDNA purificado por histidina-monolito, comparados aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras

Conteúdo analisado	Valores encontrados	Valores limites
Proteínas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Não detectada	Não detectável
RNA	Não detectado	Não detectável
Endotoxinas ($\text{EU}/\mu\text{g pDNA}$)	0,652	< 0,1 EU/ $\mu\text{g pDNA}$
gDNA ($\mu\text{g}/\mu\text{g pDNA}$)	0,00096	< 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{g pDNA}$
Pureza	100 %	>90%
Recuperação	71,6 %	----

Conforme demonstrado também por Amorim e colaboradores (2017), o suporte histidina-monolito foi eficiente na purificação da topologia superenrolada do plasmídeo HPV-16 E6/E7 com um grau de pureza de 100 % [121] e o mesmo valor foi encontrado no presente trabalho, conforme visto na tabela 10. O rendimento de recuperação também é aproximado em ambos os trabalhos, mostrando que essa matriz apresenta um bom grau de reprodutibilidade. Quanto ao nível de impurezas na amostra final de sc pDNA, a matriz também se mostra eficaz na redução dos contaminantes, com exceção das endotoxinas que apresentam um valor acima dos limites recomendados pela FDA. A vantagem do uso do histidina-monolito- é a redução do tempo dos ensaios, de aproximadamente 30 minutos, enquanto que para os outros suportes, os ensaios podem demorar cerca de 60 minutos. A explicação, é que os monolitos, constituem-se de redes internas onde os ligandos de histidina estão aderidos. As dimensões internas, definem o coeficiente de difusão das moléculas, assim sendo, para moléculas maiores, o tempo de ensaio será mais longo [102].

4.3 Impacto das condições de purificação na estrutura e atividade biológica do pDNA-p53

Após a realização da purificação do p53-pDNA através das diferentes estratégias cromatográficas, a integridade topológica do pDNA foi avaliada quanto à estabilidade estrutural, usando o dicroísmo circular, bem como a densidade de cargas negativas por potencial zeta. O objetivo deste estudo é verificar se há alguma influência das condições de purificação na estrutura do DNA e se isso poderia também afetar a atividade biológica do plasmídeo, avaliada por ensaios de transfeção celular, verificando a viabilidade celular, expressão proteica e a apoptose.

4.3.1 Influência das condições cromatográficas no pDNA-p53

As interações entre péptidos, polipéptidos e ácidos nucleicos é reconhecida em diversas funções celulares, como ligação dos fatores de transcrição ao DNA, histonas, fatores de replicação e em outras funções mediadas por proteínas e DNA. As condições naturais fisiológicas encontradas no ambiente intracelular favorecem as interações necessárias para que a manutenção celular

ocorra, como por exemplo, replicação, transcrição e tradução, resguardando a função das macromoléculas envolvidas. Reproduzir tais interações fora do ambiente celular tem sido um grande desafio, uma vez que o pH, concentração de sal, temperatura e caudal são cruciais para manter, alterar e influenciar as ligações entre os ácidos nucleicos e a matriz cromatográfica e que por sua vez podem interferir ou preservar a bioatividade do pDNA. No presente trabalho, dois diferentes aminoácidos foram usados como ligandos e três tipos de suporte foram estudados. A tabela 11 apresenta um resumo das características de cada estratégia de purificação do pDNA.

Tabela 11: Características gerais dos suportes cromatográficos em estudo e principais condições experimentais

Características		Histidina-Sepharose	Histidina-Monolito	Arginina-Macroporosa
Comportamento Predominante de Interação		Hidrofóbico	Hidrofóbico	Iônica
Condição Ligação		3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ em Tris-HCl 10 mM pH 8,0	3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ em Citrato de Sódio+EDTA 10 mM pH 5,0	Tris-HCl 10 mM pH 8,0
Condição Eluição		Tris- HCl 10 mM pH 8,0	Citrato de Sódio+EDTA 10 mM pH 5,0	2 M NaCl pH 8,0
Perfil de eluição (gradiente por passos)	Pico 1	oc pDNA + gDNA 2,3 M	Para ligar 3 M	RNA 96 mM
	Pico 2	sc pDNA 1,7 M	RNA 2,52 M	sc pDNA 500 mM
	Pico 3	RNA 0M	sc pDNA 0M	oc pDNA + gDNA 2M
Gradiente de sal para separação		Decrescente	Decrescente	Crescente
Seletividade isoforma pDNA		Sim	Sim	Parcial

O comportamento e perfil de ligação de cada matriz é dependente das características de interação que variam essencialmente com o ligando, sendo também influenciado pelo tipo e concentração de sal, pH do tampão, temperatura e por último pelo suporte onde o aminoácido está imobilizado. Analisando o caso do aminoácido de histidina, imobilizado em sepharose e monólito, verificam-se algumas diferenças nos perfis de ligação e eluição dos ácidos nucleicos. Na Histidina-Sepharose, as interações que maioritariamente prevalecem são as hidrofóbicas favorecidas pelas concentrações elevadas de sulfato de amónio, que acabam por ser quebradas aquando da diminuição da força iónica, conduzindo conseqüentemente à eluição das moléculas. O sulfato de amónio é considerado um sal cosmotrópico que em concentração adequada promove o efeito *salting out*, que leva ao rearranjo das moléculas de água, favorecendo as interações hidrofóbicas entre as moléculas e o ligando. Essas interações hidrofóbicas são então perturbadas com uma diminuição da concentração de sulfato de amónio na fase móvel. Seguindo a ordem de eluição, a isoforma oc pDNA elui no primeiro patamar do gradiente, devido à menor exposição de bases e menor hidrofobicidade. De seguida, no patamar posterior, ocorre a eluição da isoforma superenrolada, considerando a parcial exposição de bases azotadas à torsão da molécula [94]. Finalmente elui o RNA, cujo tempo de retenção é superior, devido à maior exposição das bases azotadas que estão livres para interagir mais fortemente com os ligandos de histidina. Assim, o RNA só elui quando diminui a força iónica no tampão, que desfavorece as interações hidrofóbicas [144]. Em resumo, a maior exposição das bases azotadas, garante uma mais efetiva interação com o ligando de histidina, sendo que a presença do sulfato de amónio será essencial para o estabelecimento destas interações preferenciais. No entanto, além desses efeitos dominantes, estão presentes outras interações que contribuem para o bioreconhecimento da isoforma superenrolada do pDNA, nomeadamente as pontes de hidrogénio entre a histidina as bases dos nucleótideos, as interações “*stacking*” entre os anéis apolares dos nucleótideos e de imidazol, bem como ligações mediadas por água [144]. No caso do suporte de Histidina-Monolito, além de fortes interações hidrofóbicas, as condições experimentais estabelecidas permitiram também o favorecimento de interações eletrostáticas entre as cargas negativas dos grupos fosfato da cadeia do ácido nucleico e a carga positiva do anel imidazol da histidina, conferida pelo pH 5,0 da fase móvel. As características do anel imidazol da estrutura da histidina são dependentes do pH do meio, podendo por isso influenciar as interações com as biomoléculas da amostra. Este anel possui um pKa 6,5 e portanto apresenta carga positiva em pH ácido, o que possibilita a ligação eletrostática com os grupos carregados negativamente presentes no DNA [121]. O facto de, neste caso, o RNA ter eluído antes que o pDNA, deixa claro que as interações eletrostáticas exercem alguma influência no comportamento de ligação ocorrido na matriz, ainda que interações hidrofóbicas também estivessem presentes. A eluição do RNA que ocorre primeiro que o pDNA é devida à menor capacidade de estabelecer interações eletrostáticas com o anel imidazol, considerando a sua menor dimensão, menor densidade de carga negativa devido aos grupos fosfatos e estrutura de cadeia simples. Adicionalmente, como o pDNA contém maior número de bases azotadas na sua estrutura, acaba por interagir com maior intensidade com o anel imidazol via interações cation-

π e “*ring-stacking*”, o que também contribui para um maior tempo de retenção do plasmídeo em relação ao RNA [121]. A seletividade de histidina-monolito para separar as isoformas do pDNA também se deve ao facto da estrutura superenrolada do pDNA apresentar uma maior densidade de cargas negativas, bem como maior exposição das bases azotadas devido à torsão natural da molécula, quando comparada com a isoforma oc do pDNA [120,122].

No caso do suporte macroporoso, onde a arginina está imobilizada, o comportamento de interação estabelecido entre o ligando e os ácidos nucleicos é diferente, sendo neste caso o gradiente de NaCl responsável por mediar a ligação/eluição. Algumas características do ligando de arginina, nomeadamente a sua capacidade de interagir com diferentes conformações, o tamanho da sua cadeia lateral, e a sua capacidade para formar pontes de hidrogénio geometricamente favoráveis com os ácidos nucleicos [119], permitem justificar os perfis diversos de ligação que ocorrem entre a arginina e as moléculas alvo. Para além das interações electrostáticas estabelecidas, pode igualmente verificar-se um comportamento de ligação mediado por interações hidrofóbicas entre os ácidos nucleicos e as porções alifáticas da cadeia lateral da arginina, bem como com a cadeia alifática que compõe o braço espaçador, que no conjunto, têm um papel importante na interação com o pDNA [149]. Ao nível atómico, diversos estudos têm sido realizados para explicar as interações mais favorecidas entre aminoácidos e ácidos nucleicos. No caso da arginina, foram por exemplo descritas interações do tipo bidentado, que são pontes de hidrogénio estabelecidas entre os átomos de azoto das bases guanina dos nucleótidos e os átomos de azoto do ligando de arginina [119].

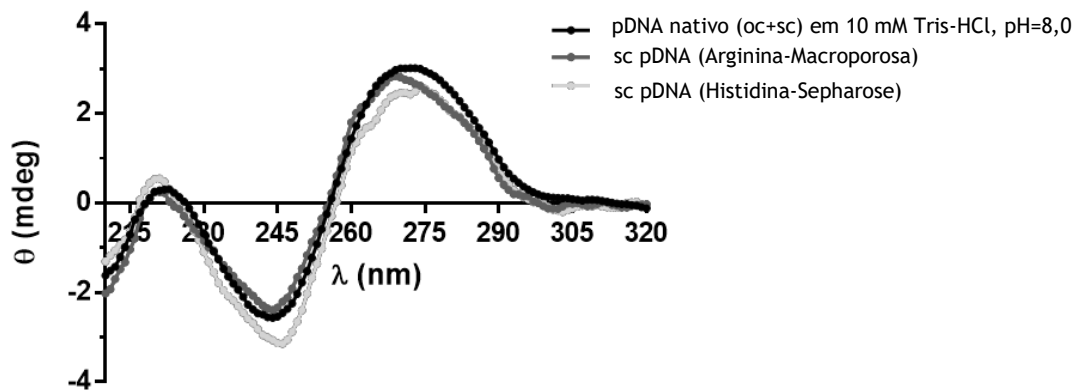
Globalmente, na interação com arginina, é esperada a eluição do RNA antes do pDNA, considerando a natureza de cadeia simples do RNA. A intensidade da ligação eletrostática pode variar, sendo proporcional ao tamanho e composição do DNA, uma vez que a disponibilidade de cargas negativas irá variar conforme o tamanho e estrutura do DNA. Quanto ao suporte macroporoso, usado na imobilização da arginina, pode referir-se que pode permitir o aumento da ligação da molécula alvo, podendo resultar num aumento de rendimento de recuperação, mas poderá não influenciar a seletividade ou favorecer a pureza da amostra final. De facto, verificou-se que, de alguma forma, ocorria a co-eluição da isoforma circular aberta com o sc pDNA. Tal como descrito num trabalho anterior [146], o aumento de pontos de ligação em um monolito, não melhorou o rendimento de recuperação da isoforma sc pDNA, e, por outro lado, a matriz histidina-agarose, que está caracterizada com menor densidade de ligandos, mostrou o melhor rendimento de recuperação, bem como o grau de pureza para a molécula alvo. Desta forma se conclui, que a seletividade e capacidade poderão ser otimizadas para cada tipo de suporte, considerando também a natureza dos ligandos e as interações estabelecidas.

4.3.1.1 Análise da topologia pDNA por dicroísmo circular

A análise por dicroísmo circular permite-nos estudar a influência do processo de purificação e das condições usadas na estrutura das moléculas de sc pDNA. Os dados relativos à análise feita por dicroísmo circular (figura 23) referem-se à amplitude e magnitude das bandas de elipticidade, em função da dispersão da luz ultravioleta (UV) num intervalo de comprimento de

onda entre 200 nm e 320 nm. Os dados do espectro de sc+oc nos tampões em estudo (citrato e Tris-HCl) indicam a presença de duas bandas positivas a 220 nm e 275 nm bem como de uma banda negativa a 245 nm, características da topologia B do DNA, que é comum à estrutura do pDNA.

A)



B)

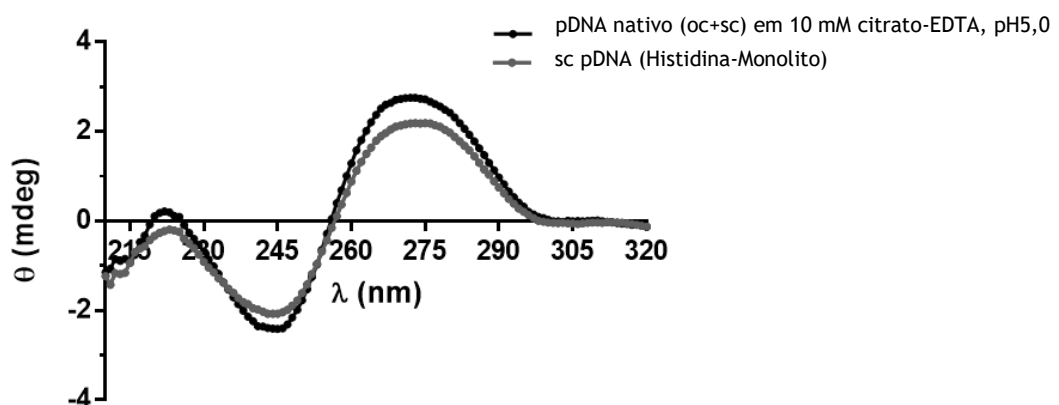


Figura 23: Análise da estrutura do pDNA por dicroísmo circular. (A) Amostras em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0. (B) Amostras em tampão Citrato 10mM + EDTA 10mM pH 5,0

Os espectros referentes às amostras de pDNA nativo (sc+oc), extraído através de um kit comercial, apresentam-se muito semelhantes, com duas bandas positivas a 220 nm e 275 nm e uma negativa a 245 nm, em ambos os espectros (a e b), sem apresentarem alterações significativas. Estes sinais no espectro indicam a topologia típica da forma B do DNA [150,151]. Quando comparamos as amostras purificadas por cromatografia com as amostras sc+oc extraídas por Kit, podemos observar ligeiras alterações dos sinais. Essas alterações podem estar associadas não só ao tampão da amostra, mas principalmente podem refletir alterações nas moléculas causadas pelas condições de ligação e eluição da amostra em cada matriz cromatográfica. As alterações são mais evidenciadas nas amostras purificadas pelo ligando de

histidina imobilizado nos diferentes suportes, sepharose e monolito, sendo que o sc purificado por monolito de histidina apresenta bandas de menor intensidade nas regiões positivas do espectro a 220 nm e 275 nm, bem como na região negativa do espectro, a 245 nm. Conforme reportado na literatura, durante o procedimento de purificação, diversos parâmetros podem ser considerados e modulados, tais como o tipo de ligando, fase móvel e condições experimentais, de forma a conseguir a melhor interação entre o ligando e a molécula alvo. No entanto, estes parâmetros podem induzir alguma alteração conformacional adicional na molécula que se vai refletir nos sinais do dicroísmo [151,152]. O diferente comportamento de interação entre a molécula alvo e a matriz e as diferentes condições usadas podem explicar as pequenas diferenças encontradas para os plasmídeos purificados pelas duas matrizes de histidina, visto que para além de outras interações relativamente fracas, em histidina-sepharose as interações que predominam são hidrofóbicas [144], enquanto que as interações hidrofóbicas mas também eletrostáticas, são responsáveis pela ligação do sc pDNA na matriz histidina-monolito [121], promovidas pela utilização de uma fase móvel de diferente composição (Citrato de Sódio + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + EDTA, pH 5,0). A análise dos espectros de dicroísmo evidenciam também que o sinal do sc pDNA purificado pela Arginina-Macroporosa apresenta um pequeno desvio na região positiva para aproximadamente 270 nm, enquanto que os purificados por histidina têm a elipticidade máxima a 275 nm. Esse pormenor também pode ser um reflexo das condições de ligação da molécula alvo à matriz, promovida pelas condições da fase móvel, pois sabe-se que o dicroísmo circular reflete sensivelmente pequenas alterações conformacionais no DNA [153]. Adicionalmente, a técnica de dicroísmo circular também sugere a homogeneidade da molécula purificada, uma vez que a alta sensibilidade instrumental dessa técnica, revelaria espectros diferentes em caso de contaminação por outras moléculas, como por exemplo, proteínas e endotoxinas. Globalmente, como sinais de dicroísmo observado, evidenciam-se as duas bandas positivas (220 e 275 nm) e uma negativa 245, típicas da topologia B do DNA [150,151], não mostrando maiores perturbações dessas bandas, sendo sugerido que as topologias não sofreram deformações significativas.

4.3.1.2 Análise potencial zeta

As soluções de pDNA preparadas em Tris-HCl pH 8,0 e citrato de sódio pH 5,0 foram avaliadas por Zetasizer Nano-ZS, afim de se determinar a carga superficial do pDNA em cada ambiente, que é estabelecido através do equilíbrio das cargas da superfície da molécula e a concentração e tipo de iões presentes na solução [154]. O resultado destes ensaios é apresentado na figura 24.

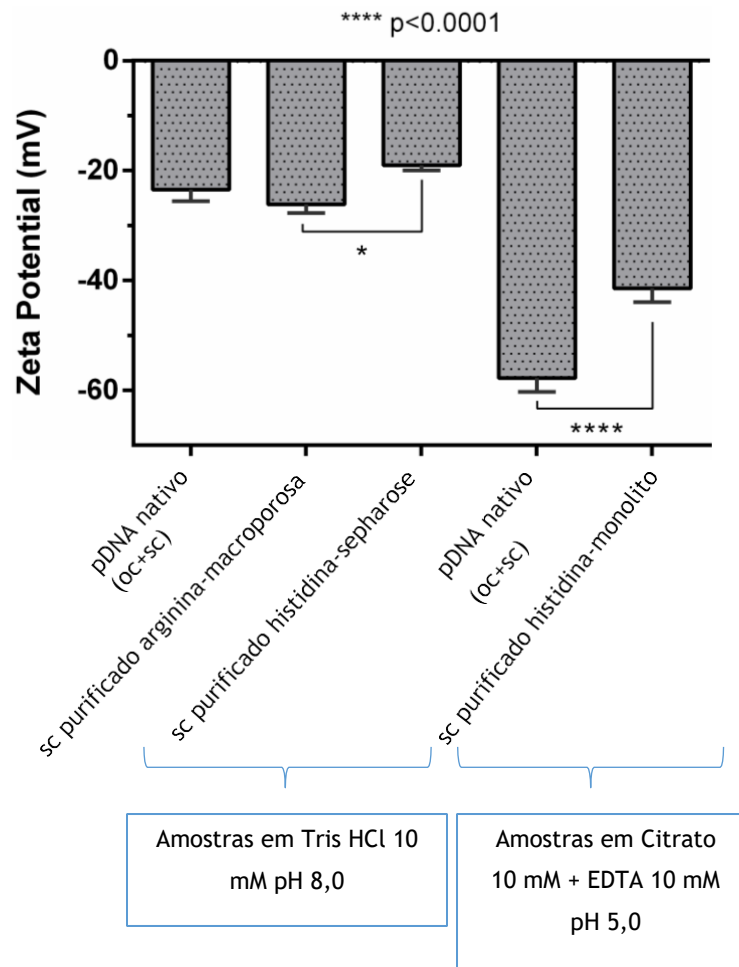


Figura 24: Análise do potencial zeta das moléculas de pDNA purificado através das colunas: Histidina-sepharose; Arginina-macroporosa e histidina-monolito, nos respetivos tampões de eluição. O potencial zeta de amostras de pDNA nativo também é mostrado.

As moléculas de pDNA apresentam cargas negativas em sua superfície e quando em solução interagem eletrostaticamente com os iões presentes nessa solução e essa interação irá garantir a repulsão ou a estabilização dessas moléculas no ambiente. A interação é estabelecida com uma camada de contra-iões, neste caso iões positivos que interagem fortemente com os grupos carregados negativamente na superfície da molécula do pDNA, originando uma camada compacta ou camada de *stern*, onde os iões são imóveis. Esta camada é circundada por iões de carga contrária que se organizam para neutralizar a estrutura carregada, no caso, estes iões estão em movimento e por isso recebe o nome de camada difusa [155]. A estabilidade da molécula em suspensão, é dependente tanto de forças de van der Waals como da dupla camada elétrica formada pelos iões e contra-iões, que no caso de produtos terapeuticos, podem influenciar tanto na absorção celular, como no transporte intracelular [156]. O potencial zeta, que é determinado pela composição dos iões envolvidos nessas camadas, pode ser influenciado tanto pela força iónica, como pelo pH da solução [157]. Na figura 24, as amostras extraídas através do Kit comercial (oc + sc) demonstram claramente uma significativa alteração do

potencial zeta, influenciado principalmente pela diferença de pH do tampão da solução, embora a constituição dos tampões também seja diferente, o principal fator a influenciar será o pH. As amostras purificadas através das colunas cromatográficas e que estão em tampão Tris-HCl (pH 8) também apresentaram uma ligeira diferença entre si, quanto ao valor de potencial zeta, mesmo estando em pH 8,0. Esse facto pode ser atribuído aos sais utilizados durante os procedimentos de purificação, que mesmo após o processo de dessalinização das amostras, podem ainda estar presentes em quantidades vestigiais, sendo suficientes para alterar a constituição iónica na dupla camada eléctrica do colóide. Um potencial zeta menos negativo encontrado para a amostra purificada pela matriz de histidina-sepharose, quando comparado ao potencial zeta mais negativo encontrado na amostra purificada pela arginina-macroporosa, reflete uma menor densidade de cargas negativas presentes na estrutura do DNA. Uma possível explicação é que um maior grau de enrolamento na molécula de DNA, pode estar ocultando regiões negativas do DNA purificado por histidina-sepharose e isso alteraria as constituições dos íões que compõe a dupla camada eléctrica que envolve o DNA na solução [107].

Uma grande diferença foi observada quando comparamos as amostras purificadas por cromatografia e armazenadas em Tris-HCl (pH 8), que apresentam uma densidade de cargas negativas entre -20 e -25 mV, contra a amostra purificada e armazenada em tampão citrado de sódio pH 5, que apresenta um potencial zeta próximo de -40 mV e entre as amostras extraídas através do Kit, essa diferença é ainda mais pronunciada. A grande diferença do potencial zeta observada, pode indicar que a diminuição do pH resulta em valores de zeta potencial mais negativos, refletindo uma maior exposição das regiões negativas da amostra purificada, podendo indicar também uma forma mais relaxada da molécula. Moléculas polianiónicas como o DNA, apresentam uma maior densidade de cargas negativas, quando em meio ácido, em conformidade com a quantidade de protões disponíveis em solução. Esse fato, pode ser constatado olhando para o resultado acima em comparação com o meio alcalino. Como mencionado anteriormente, quando comparamos os dados do dicroísmo circular que se referem as amostras purificadas pelos ligandos de histidina nos diferentes suportes (sepharose e monolito) com a amostra sc+oc extraído pelo kit comercial, observamos algumas diferenças no espectro, ainda que ligeiras, o que poderia enfatizar uma mudança conformacional, que podem também ser em função do comportamento de ligação ocorrido no interior da matriz cromatográfica.

4.3.1.3 Ensaios citotoxicidade

O estudo de citotoxicidade foi realizado para avaliar a possibilidade de ocorrer alguma toxicidade associada à molécula de sc pDNA ou mesmo ao veículo de transporte do material genético, nesse caso, Lipofectamina (Figura 25). Sem esses estudos prévios, não poderíamos garantir se a morte celular seria em função da apoptose mediada pelo gene terapêutico (p53) ou resultado de toxicidade.

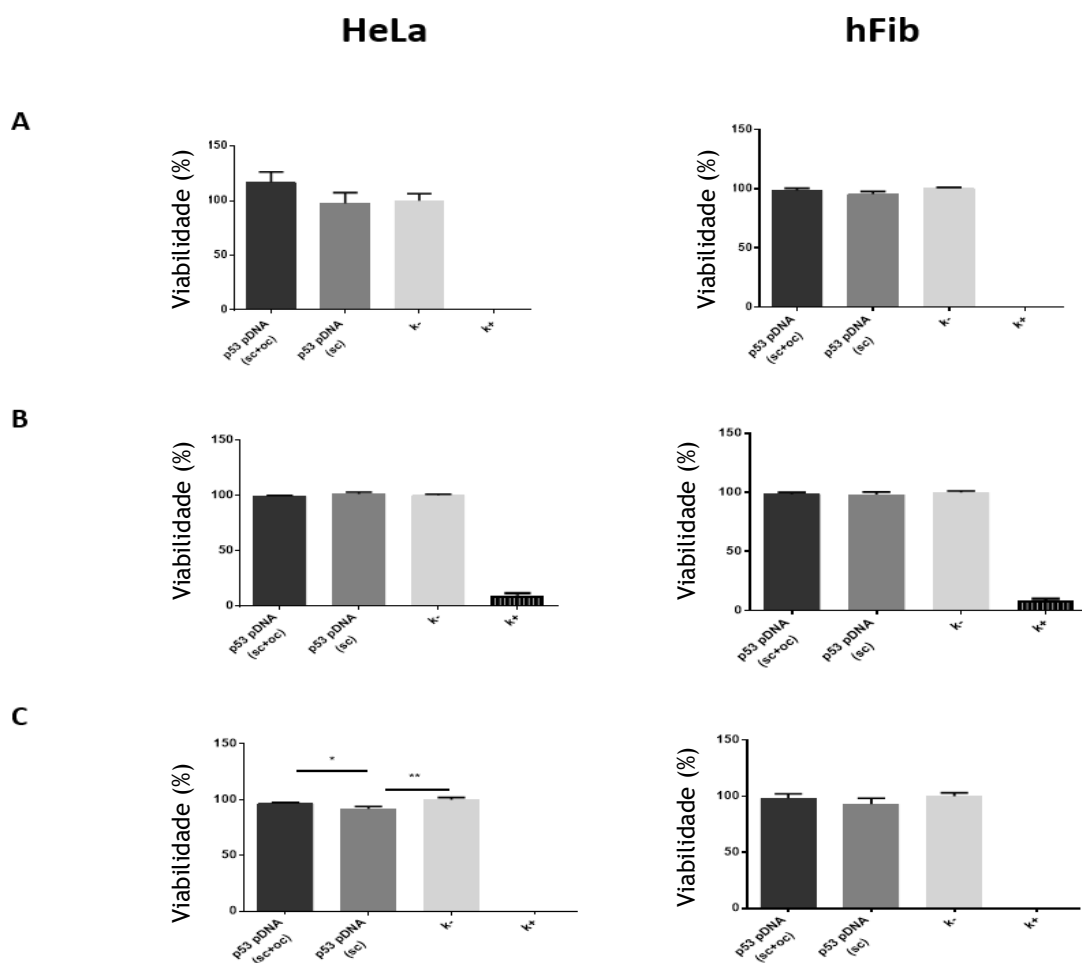


Figura 25: Análise de viabilidade celular após a transfeção com complexo Lipofectamina 2000-pDNA-p53 em linhas celulares de HeLa e hFib, após 48 horas de transfeção. (A) sc pDNA-p53 recuperado da matriz histidina-sepharose; (B) sc pDNA-p53 recuperado da matriz arginina-macroporosa; (C) sc pDNA-p53 recuperado da matriz histidina-monolito; Células não transfetadas foram usadas como controlo negativo para citotoxicidade (k-). Células tratadas com etanol foram usadas para controlo positivo (k+). Informação representada com significância \pm s.e.m, n=3 (n.s. representa diferença não significativa)

Para os testes de citotoxicidade, células do cancro cervical (HeLa) e fibroblastos, do tecido conjuntivo humano (hFib) foram comparadas após o procedimento de transfeção com o complexo lipofectamina-sc pDNA. Na figura 25 A e B, em ambas as linhas celulares, a viabilidade celular se mantém em 100 %, não sendo demonstrado qualquer efeito citotóxico. Por outro lado, na figura 25 C, é observado um ligeiro decréscimo na viabilidade em ambas as linhas celulares, após as 48 horas de transfeção com o complexo lipofectamina-sc pDNA. Este resultado poderia estar associado a alguma agressividade da formulação a pH 5, que foi usada na purificação da amostra pela coluna cromatográfica histidina-monolito, ou poderia também estar associado a alguma taxa de apoptose mediada pelo gene terapêutico p53. Resultados semelhantes foram também observados em um trabalho recente, onde os autores verificaram um decréscimo na viabilidade celular, que posteriormente foi comprovado ser consequência da

maior taxa de expressão da proteína p53, bem como dos maiores níveis de apoptose mediada pelo gene terapêutico [158].

Globalmente, os resultados apresentados sugerem que as formulações usadas, complexo lipofectamina-pDNA, não demonstraram toxicidade que seja significativa, uma vez que as células apresentam uma viabilidade >95%, em todos os casos. Esses dados permitem o prosseguimento dos ensaios *in vitro*, já que não foi verificada uma perda de viabilidade celular quando as células são expostas à formulação.

4.3.1.4 Análise da expressão da proteína p53

Cada amostra de sc pDNA, purificado pelas três estratégias cromatográficas, complexadas com lipofectamina foi usada na transfeção de células HeLa, para avaliar a sua bioatividade, através da quantificação da expressão da proteína p53, por ELISA. A escolha de células HeLa para os estudos de bioatividade, relaciona-se com a melhor capacidade demonstrada por esse tipo celular para internalizar o complexo lipofectamina - sc pDNA, como descrito recentemente por Valente e colaboradores [158].

As análises de quantificação da proteína realizadas 48 horas após a transfeção das células com os complexos lipofectamina-sc p53-pDNA pode ser observada na figura 26.

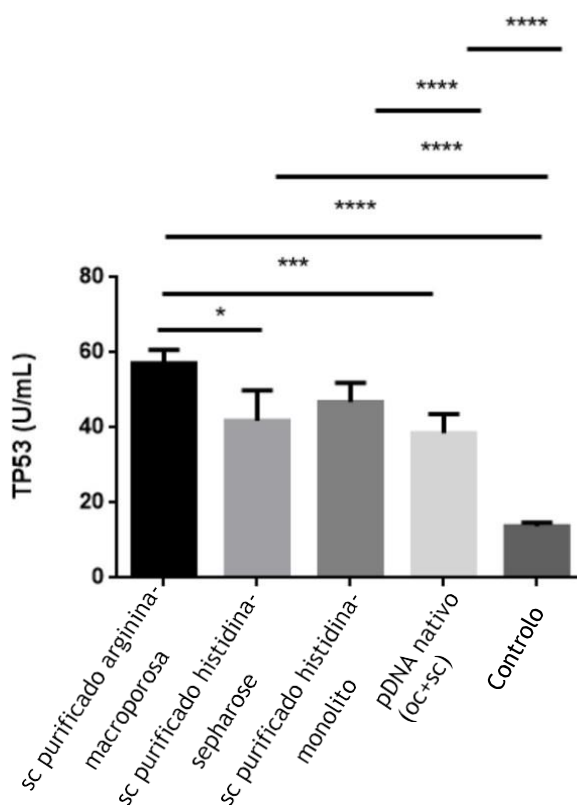


Figura 26: Teste de ELISA, mostrando a taxa de expressão da proteína p53 após 48 horas de transfeção com os complexos lipofectamina-sc p53-pDNA, em células do carcinoma cervical (HeLa). Células não transfetadas foram usadas como controle. As informações são representadas com uma média ± erro padrão (S.D.)

Os dados da figura 26, mostram que a bioatividade do plasmídeo foi mantida após todos os procedimentos desde a extração por lise alcalina, os procedimentos usados nas três estratégias cromatográficas e o processo de dessalinização na etapa posterior à purificação. A isoforma sc p53-pDNA purificada pela matriz macroporosa de arginina apresentou o melhor resultado, pois mostrou uma expressão da proteína terapêutica 4 vezes maior que o controlo, seguido do purificado por histidina-monolito e finalmente pelo purificado com o suporte histidina-sepharose que apresentaram uma ligeira diferença entre eles. Para o grupo controlo, células cancerígenas não transfetadas foram usadas e como esperado essas células ainda apresentam alguma expressão de níveis basais da proteína p53. Amostras de pDNA nativo (oc + sc) obtidas através de um Kit comercial, também foram usadas neste ensaio afim de se comparar com as amostras purificadas com as estratégias cromatográficas estabelecidas no nosso grupo de investigação. A expressão da proteína p53 resultante da transfeção de células com o plasmídeo extraído pelo Kit também apresenta resultados satisfatórios, mas não são adequados ao uso *in vivo*, uma vez que o procedimento inclui a utilização da enzima RNase de origem animal, que além dos custos associados, seu uso não é recomendado pela FDA nas formulações. Mesmo quando comparamos as amostras purificadas por cromatografia e a amostra purificada por Kit, percebemos que há uma maior expressão do gene terapêutico nas formulações purificadas através da cromatografia. Olhando esses resultados de expressão da p53 e comparando-os com os resultados do grau de pureza das isoformas, observamos que o plasmídeo purificado pela arginina parece ter mantido uma maior bioatividade, ainda que com um grau de pureza ligeiramente inferior (92%), e este facto pode estar relacionado com a menor quantidade de sal usado durante a eluição do plasmídeo (500 mM de NaCl), o que nos permitiu uma menor manipulação da molécula durante a etapa de dessalinização do pDNA purificado, sendo usado um menor tempo de centrifugação, a uma menor velocidade de rotação. Para além disso, terá também contribuído para a maior atividade do pDNA, o facto de o NaCl ser um sal mais inócuo comparado com o sulfato de amónio, usado nas outras formulações. As amostras purificadas através do monolito de histidina e histidina-sepharose, mesmo apresentando um grau de pureza maior que o purificado por arginina ($\approx 100\%$), apresentaram uma bioatividade menor, sendo que histidina-monolito ainda apresentou melhores resultados da expressão de p53, em relação ao purificado por histidina-sepharose. Comparando a bioatividade dos plasmídeos purificados através destas duas matrizes com histidina como ligando, devemos considerar que a amostra purificada por histidina-monolito, apresentou melhores resultados de bioatividade em relação a amostra purificada pela histidina-sepharose. Essa preservação da bioatividade pode ser devida ao menor tempo do ensaio cromatográfico, devido também à eluição da molécula na ausência de sal, o que facilitou também o processo de dessalinização. Ao contrário, a amostra purificada através de histidina-sepharose foi recuperada a uma concentração de sulfato de amónio de 1,7 M, requerendo um processo de dessalinização mais drástico, sendo o próprio ensaio mais longo (aproximadamente 60 minutos), podendo contribuir para a menor atividade do pDNA.

4.3.1.5 Avaliação da Apoptose mediada pela expressão da p53

Após a análise dos níveis de expressão de p53, foi avaliada a apoptose celular mediada pela proteína p53. A figura 27, mostra os resultados da apoptose referentes à transfecção celular com o produto terapêutico purificado pelas diferentes matrizes cromatográficas.

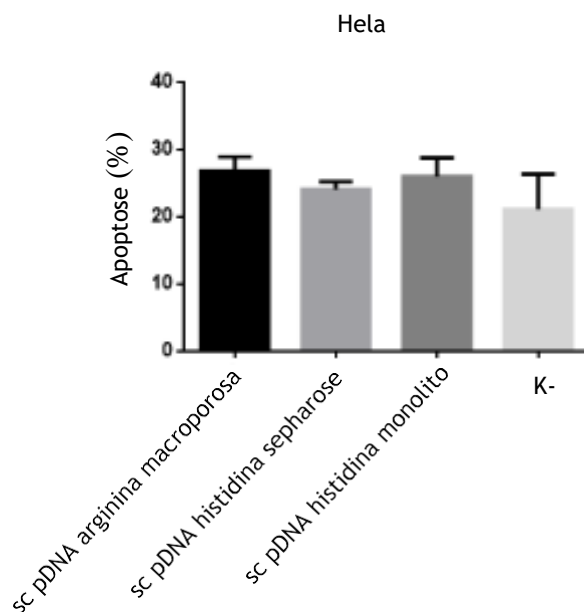


Figura 27: Avaliação da apoptose mediada pela proteína P53 em células do cancro cervical (HeLa), após tratamento com o plasmídeo terapêutico pDNA-p53 purificado através das matrizes cromatográficas: Histidina sepharose; Arginina macroporosa; Histidina monolito. K- refere-se ao grupo controlo, ou seja, células HeLa que não receberam tratamento com o pDNA-p53. As informações são representadas com uma média \pm erro padrão (S.D.)

Os resultados acima refletem uma taxa de apoptose de 6%, 3% e 5% superior nas células HeLa transfectadas com as amostras purificadas pelas matrizes de arginina-macroporosa, histidina-sepharose e histidina-monolito, respetivamente, quando comparadas ao grupo controlo (k-). O fundamento do método usado para análise da apoptose usada no presente trabalho, baseia-se na adição de nucleotídeo marcado com biotina, pela enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT), à extremidade do DNA fragmentado no processo apoptótico, permitindo a análise da apoptose celular pouco antes de se finalizar o ciclo. Nesse contexto, é razoável mencionar que devido a agressividade típica de tumores avançados, quebras cromossômicas podem estar presentes, devido as diversas modificações genéticas constantes no interior celular e assim aos fragmentos de DNA gerados, são também adicionados os nucleotídeos biotinilados, como ocorre ao controlo negativo (k-). Comparando os resultados dos testes de expressão da proteína p53 (figura 26) com os testes de apoptose (figura 27), observamos um padrão, onde células que tiveram taxas maiores de expressão da p53, também apresentaram as maiores taxas de apoptose mediada pelo gene terapêutico, seguindo a tendência decrescente nas amostras de: arginina-macroporosa, histidina-monolito e histidina-sepharose. A taxa de apoptose

mediada pela proteína p53 foi avaliada em outros trabalhos, a exemplo cita-se a utilização do plasmídeo p53 purificado através da coluna de arginina-sepharose. Os autores transfetaram células HeLa e A549 (células de cancro do pulmão) com a isoforma superenrolada do pDNA-p53, obtendo uma taxa apoptótica de aproximadamente 15% e 4% respetivamente, associando possíveis formas de resistência a apoptose, pelas células A549 [45]. Dados mais recentes foram obtidos por Valente e colaboradores (2018), onde os autores mostraram uma taxa de apoptose em células HeLa, de aproximados 35% e em A549 de aproximadamente 11%. Esses autores usaram a coluna cromatográfica metionina-agarose para purificar a isoforma do plasmídeo terapêutico, sc pDNA-p53 [158]. Em ambos os trabalhos mencionados, os autores usaram a abordagem da Anexina V conjugada com fluorocromo. Nesse método as fosfatidilserinas externalizadas na membrana celular, durante os estágios iniciais da apoptose são marcadas pela Anexina V, permitindo a quantificação da taxa de apoptose *early*, por citometria de fluxo e da mesma forma, essa abordagem também permite a quantificação da apoptose *late*, através da marcação de ácido nucleico com Iodeto de Propídeo. Apesar de os plasmídeos terapêuticos terem sido os mesmos (pDNA-p53), não somente a abordagem para se medir a apoptose foi diferente, mas também as condições de purificação utilizada para isolar o plasmídeo terapêutico. Considerando as diferentes metodologias utilizadas, os trabalhos forneceram dados sobre a influência que o gene terapêutico, usado também nesse trabalho, exerce a nível das células HeLa, sugerindo mais uma vez que diferentes condições de purificação usadas podem de facto causar impacto na bioatividade do plasmídeo. É importante salientar que apesar da literatura reportar que a p53 é o principal gene supressor de tumor, existem também outras proteínas envolvidas na via metabólica da apoptose e a inatividade ou uma atividade reduzida de qualquer dessas proteínas, poderiam comprometer o ciclo apoptótico. No entanto, se considerarmos a complexidade do cancro, entendemos que não só um, mas diversos genes no genoma podem ser afetado por diferentes tipos de mutação e da mesma forma sequências promotoras desses genes, que podem igualmente inativar ou mesmo reduzir a expressão de uma determinada proteína. Existem casos conhecidos de cancros do colon, mama, cérebro, ou pâncreas, que apresentam em média 33 a 66 diferentes tipos de mutação genética e em outros casos até 200 tipos de danos no material genético são detetados [75]. Com base nessa informação, podemos considerar que outros genes envolvidos na cascata que desencadeia apoptose podem também estar inativados. Para além disso, é reconhecido o fato de que uma célula cancerígena está em constante mutação, objetivando maior vantagem propagativa garantindo não só supressão de qualquer mecanismo de morte programada da célula como também a especialização de genes de crescimento, analogamente a evolução Darwiniana, as células cancerígenas mais adaptadas são aquelas com mais chance de se propagar [159]. Em um estudo que revela a intrincada estrutura genética após sucessivos eventos mutacionais ocorridos em células HeLa quase 70 anos após a extração das células da paciente Henrieta Lacks, pesquisadores demonstraram que as aberrações genéticas ocorridas durante esses anos, podem ter implicações desconhecidas em experimentos biológicos, uma vez que essas células possuem uma instabilidade genómica típica dos tumores [160, 161].

Capítulo 5

5 Conclusão e Perspetivas Futuras

A cromatografia tem sido uma ferramenta indispensável para a obtenção de produtos terapêuticos, mas o resultado em termos de estabilidade e bioatividade das moléculas em função de parâmetros experimentais como pH, temperatura ou força iónica, podem comprometer o objetivo final da terapia génica. Desta forma, o presente trabalho foi fundamental para perceber o efeito destas condições na estrutura e atividade do plasmídeo após os processos cromatográficos, analisando a estrutura por dicroísmo circular, a carga superficial por determinação do potencial zeta, e a bioatividade por avaliação da expressão da proteína p53 e a apoptose mediada pela expressão do gene supressor do tumor. Nesse trabalho verificou-se que as estratégias cromatográficas utilizadas mostraram-se eficazes na separação do sc pDNA-p53, pois os três suportes purificaram a isoforma superenrolada do plasmídeo terapêutico acima dos níveis exigidos pelas agências reguladoras. Entre os três suportes, o que permitiu a purificação do sc pDNA com uma maior eficiência foi histidina-sepharose (97%) sendo mais eficaz que histidina-monolito, que apesar de ter garantido uma pureza maior para o sc-pDNA (100%), não foi tão eficiente na redução das endotoxinas, que se mostraram ligeiramente acima do limite máximo recomendado pela FDA (0,5 EU/ μ g pDNA). No que diz respeito à eficiência de purificação conseguida pelo suporte de arginina, verificou-se que o grau de pureza da amostra, ainda que acima do limite mínimo recomendado, manteve-se abaixo dos valores de pureza alcançados com a utilização dos restantes suportes. Ainda assim, esta foi a melhor estratégia de purificação, pois o plasmídeo purificado foi o que mostrou uma melhor bioatividade nos ensaios de expressão da proteína e apoptose. Esse facto pode estar associado ao uso de baixas concentrações de sal para a eluição da isoforma superenrolada, para além de ser utilizado o NaCl como sal, que resulta numa estratégia mais suave e de menor impacto a nível ambiental, estrutural e de atividade, comparativamente ao sulfato de amónio usado nas restantes estratégias. Comparando as matrizes baseadas no aminoácido de histidina como ligando, verificou-se que o suporte histidina-monolito parece ter preservado mais a bioatividade da molécula e esse facto pode ser devido ao menor tempo de ensaio cromatográfico e o menor tempo de dessalinização da amostra, uma vez que sc pDNA-p53 eluiu da coluna apenas com o tampão citrato de sódio, enquanto que em histidina-sepharose o sc pDNA-p53 elui com 1,7 M de sulfato de amónio, requerendo maior tempo de centrifugação para dessalinização da amostra. Considerando o espectro do dicroísmo circular, apesar de ligeiros desvios observados nos gráficos, conclui-se que a nível estrutural parece não ter havido uma mudança significativa causada pelos parâmetros de purificação, uma vez que a topologia B do pDNA foi mantida. O potencial zeta mostrou que as três formulações usadas são adequadas para o armazenamento das partículas uma vez que além de preservar a integridade do DNA, favorece também a dispersão das partículas no meio, aumentando a meia vida do produto armazenado. Globalmente, essas informações mostram claramente a influência que os parâmetros de purificação, tais como força iónica, temperatura ou pH exercem na estrutura da molécula terapêutica influenciando a bioatividade da mesma.

Os dados deste trabalho também sugerem que a investigação acerca da influência dos parâmetros cromatográficos, por serem de facto relevantes para a bioatividade da molécula, devem ser continuados através da avaliação do uso de outros suportes, especialmente aqueles onde o NaCl é necessário para as interações entre o plasmídeo e o aminoácido, uma vez que o uso desse sal mostrou-se menos agressivo para a bioatividade do DNA. Neste trabalho, a amostra purificada pela arginina permitiu a expressão de quantidades significativas da proteína terapêutica e levando em consideração os 92% de pureza da amostra, poderíamos esperar uma maior expressão da proteína se houvesse ainda uma maior pureza da amostra, o que poderia ser conseguido com o uso de arginina imobilizada em agarose ou mesmo arginina modificada em suporte monolito. O facto de se usar suportes monolíticos, permite a redução do tempo dos ensaios o que representa uma vantagem para a preservação da bioatividade da molécula, bem como para o tempo de produção do biofármaco. Da mesma forma, o uso da lisina em suporte monolito representaria uma grande vantagem e assim sendo, uma comparação do uso desses aminoácidos em função dos parâmetros investigados nesse trabalho poderiam indicar a estratégia mais eficiente de produção em termos de rendimento final, maior grau de pureza da molécula e que preserve a melhor bioatividade do produto terapêutico. De igual importância para o aumento da rentabilidade dos plasmídeos terapêuticos, são os desenvolvimentos das etapas *upstream*, para a biossíntese da molécula, maximizando ainda mais a produção do produto final. Abordagens mais futurísticas visam a redução do tamanho do plasmídeo usado como vetor de genes terapêuticos, objetivando a eliminação de sequências desnecessárias, com sítios de clivagem que aumentam a susceptibilidade da molécula à ação de enzimas de restrição. A redução do tamanho do vetor poderá também maximizar a replicação do plasmídeo no interior da célula hospedeira, considerando o facto de que moléculas grandes representam uma maior carga metabólica para as células [90,89]. Relativamente ao tamanho da molécula a literatura também reporta que plasmídeos maiores que 5Kb são mais susceptíveis aos stresses por cisalhamento causados devido às manipulações fora das células, como por exemplo, no momento da extração por lise alcalina [30]. Futuramente, esses plasmídeos podem estar disponíveis, aumentando o rendimento de produção das moléculas terapêuticas na etapa de biossíntese celular, reduzindo a susceptibilidade à degradação durante as etapas de lise alcalina e, quando associado a melhores estratégias de purificação, reduziriam ainda mais os custos finais dos produtos terapêuticos. Considerando o uso da proteína p53, com ação na terapia do cancro, deverá também continuar a ser avaliada esta abordagem, medindo-se a taxa de morte celular em outros tipos de células tumorais, especialmente em células de doentes recém diagnosticados com cancro, para se confirmar se existe ou não apoptose mediada pela p53, eliminando possíveis interferências de sucessivas mutações em decorrência do cancro em estágio tardio, como reportado em células de HeLa. Uma alternativa ao uso de células HeLa poderia ser feita através de uma parceria com hospitais regionais, onde as células de pacientes removidas por biopsia poderia ser usadas nos ensaios laboratoriais. Além dos esforços feitos pela ciência no sentido de controlar ou encontrar um tratamento para o cancro e considerando

que o aparecimento do tumor é maioritariamente devido a fatores externos, uma ação combinada com políticas públicas de consciencialização e prevenção também são importantes para a redução dos casos da doença, o que diminuiria muito do sofrimento humano direto e indireto, além de reduzir os custos com tratamentos da doença. Nessa vertente, é interessante ressaltar que fatores ambientais e comportamentais são grandes responsáveis pelos aumentos de casos de cancro e esses fatores incluem: tabaco, sobrepeso ou obesidade, deficiência no consumo de vegetais e frutas, álcool, sedentarismo, infecções como HPV, hepatite ou outras infecções carcinogênicas, poluição urbana, radiação ionizante e ultravioleta (<https://www.cancerresearchuk.org>).

Capítulo 6

6 Referências Bibliográficas

- [1] O. Gjoerup, D. Zaveri, and T. M. Roberts, "Induction of p53-Independent Apoptosis by Simian Virus 40 Small t Antigen," *J. Virol.*, vol. 75, no. 19, pp. 9142-9155, Oct. 2001.
- [2] D. A. Jackson, R. H. Symons, and P. Berg, "Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 69, no. 10, pp. 2904-9, Oct. 1972.
- [3] T. Friedmann and R. Roblin, "Gene Therapy for Human Genetic Disease?," *Science (80-.)*, vol. 175, no. 4025, pp. 949-955, Mar. 1972.
- [4] E. S. Lander *et al.*, "Initial sequencing and analysis of the human genome.," *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 860-921, Feb. 2001.
- [5] J. C. Venter *et al.*, "The Sequence of the Human Genome," *Science (80-.)*, vol. 291, no. 5507, pp. 1304-1351, Feb. 2001.
- [6] F. S. Collins, M. Morgan, and A. Patrinos, "The Human Genome Project: lessons from large-scale biology.," *Science*, vol. 300, no. 5617, pp. 286-90, Apr. 2003.
- [7] C. L. Hardee, L. M. Arévalo-Soliz, B. D. Hornstein, and L. Zechiedrich, "Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy.," *Genes (Basel)*, vol. 8, no. 2, p. 65, Feb. 2017.
- [8] A. Mountain, "Gene therapy: the first decade.," *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 3, pp. 119-28, Mar. 2000.
- [9] T. Wirth, N. Parker, and S. Ylä-Herttuala, "History of gene therapy.," *Gene*, vol. 525, no. 2, pp. 162-9, Aug. 2013.
- [10] K. Gregory-Evans, A. M. A. E. Bashar, and M. Tan, "Ex vivo gene therapy and vision.," *Curr. Gene Ther.*, vol. 12, no. 2, pp. 103-15, Apr. 2012.
- [11] T. P. O'Connor and R. G. Crystal, "Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, no. 4, pp. 261-76, Apr. 2006.
- [12] C. J. Wallach, L. G. Gilbertson, and J. D. Kang, "Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration.," *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 28, no. 15 Suppl, pp. S93-8, Aug. 2003.
- [13] E. H. Kaji and J. M. Leiden, "Gene and stem cell therapies.," *JAMA*, vol. 285, no. 5, pp. 545-50, Feb. 2001.
- [14] R. M. Blaese *et al.*, "T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years," *Science (80-.)*, vol. 270, no. 5235, pp. 475-480, Oct. 1995.

- [15] R. H. Buckley, "Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 22, no. 1, pp. 625-55, Apr. 2004.
- [16] C. E. Thomas, A. Ehrhardt, and M. A. Kay, "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 4, no. 5, pp. 346-58, May 2003.
- [17] S. E. Raper *et al.*, "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer.," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 80, no. 1-2, pp. 148-58, Sep. 2003.
- [18] S. Hacein-Bey-Abina *et al.*, "LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1," *Science (80-.)*, vol. 302, no. 5644, pp. 415-419, Oct. 2003.
- [19] B. Li, N. Gao, Z. Zhang, Q. Chen, L.-J. Li, and Y. Li, "Historical and Clinical Experiences of Gene Therapy for Solid Cancers in China.," *Genes (Basel)*, vol. 8, no. 3, p. 85, Feb. 2017.
- [20] R. Gardlík, R. Pálffy, J. Hodosy, J. Lukács, J. Turna, and P. Celec, "Vectors and delivery systems in gene therapy.," *Med. Sci. Monit.*, vol. 11, no. 4, pp. RA110-21, Apr. 2005.
- [21] T. Vellai and G. Vida, "The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells.," *Proceedings. Biol. Sci.*, vol. 266, no. 1428, pp. 1571-7, Aug. 1999.
- [22] L. M. Verissimo, L. F. A. Lima, L. C. M. Egito, A. G. de Oliveira, and E. S. T. do Egito, "Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy.," *J. Drug Target.*, vol. 18, no. 5, pp. 333-42, Jun. 2010.
- [23] D. R. Gill, I. A. Pringle, and S. C. Hyde, "Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors.," *Gene Ther.*, vol. 16, no. 2, pp. 165-71, Feb. 2009.
- [24] T. Alam, P. Wai, D. Held, S. T. T. Vakili, E. Forsberg, and H. Sollinger, "Correction of Diabetic Hyperglycemia and Amelioration of Metabolic Anomalies by Minicircle DNA Mediated Glucose-Dependent Hepatic Insulin Production.," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e67515, Jun. 2013.
- [25] A. Baldo, E. van den Akker, H. E. Bergmans, F. Lim, and K. Pauwels, "General considerations on the biosafety of virus-derived vectors used in gene therapy and vaccination.," *Curr. Gene Ther.*, vol. 13, no. 6, pp. 385-94, Dec. 2013.
- [26] F. J. Fallaux *et al.*, "New Helper Cells and Matched Early Region 1-Deleted Adenovirus Vectors Prevent Generation of Replication-Competent Adenoviruses," *Hum. Gene Ther.*, vol. 9, no. 13, pp. 1909-1917, Sep. 1998.
- [27] S. Chira *et al.*, "Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors.," *Oncotarget*, vol. 6, no. 31, pp. 30675-703, Oct. 2015.

- [28] A. L. Silva *et al.*, "Physical factors affecting plasmid DNA compaction in stearylamine-containing nanoemulsions intended for gene delivery.," *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 5, no. 6, pp. 643-54, Jun. 2012.
- [29] A. J. Griffiths, "Natural plasmids of filamentous fungi.," *Microbiol. Rev.*, vol. 59, no. 4, pp. 673-85, Dec. 1995.
- [30] M. S. Levy, R. D. O'Kennedy, P. Ayazi-Shamlou, and P. Dunnill, "Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA," *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 7, pp. 296-305, Jul. 2000.
- [31] P. H. Oliveira, K. J. Prather, D. M. F. Prazeres, and G. A. Monteiro, "Structural instability of plasmid biopharmaceuticals: challenges and implications," *Trends Biotechnol.*, vol. 27, no. 9, pp. 503-511, Sep. 2009.
- [32] P. F. Ertl and L. L. Thomsen, "Technical issues in construction of nucleic acid vaccines.," *Methods*, vol. 31, no. 3, pp. 199-206, Nov. 2003.
- [33] F. Silva, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues, "Plasmid DNA fermentation strategies: influence on plasmid stability and cell physiology.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 6, pp. 2571-80, Mar. 2012.
- [34] S. Million-Weaver and M. Camps, "Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked?," *Plasmid*, vol. 75, pp. 27-36, Sep. 2014.
- [35] S. Bedhomme, D. Perez Pantoja, and I. G. Bravo, "Plasmid and clonal interference during post horizontal gene transfer evolution.," *Mol. Ecol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1832- 1847, Apr. 2017.
- [36] G. del Solar, R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarría, M. Espinosa, and R. Díaz-Orejas, "Replication and control of circular bacterial plasmids.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 2, pp. 434-64, Jun. 1998.
- [37] P. Maier, C. von Kalle, and S. Laufs, "Retroviral vectors for gene therapy.," *Future Microbiol.*, vol. 5, no. 10, pp. 1507-23, Oct. 2010.
- [38] K. Kawabata, Y. Takakura, and M. Hashida, "The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake.," *Pharm. Res.*, vol. 12, no. 6, pp. 825-30, Jun. 1995.
- [39] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, and D. G. Anderson, "Non-viral vectors for gene-based therapy," *Nature Reviews Genetics*, vol. 15, no. 8, pp. 541-555, 2014.
- [40] S. Mehier-Humbert and R. H. Guy, "Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 5, pp. 733-53, Apr. 2005.

- [41] L. Lambricht, A. Lopes, S. Kos, G. Sersa, V. Pr eat, and G. Vandermeulen, "Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery.," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, no. 2, pp. 295-310, Feb. 2016.
- [42] M. Huang, R. Sun, Q. Huang, and Z. Tian, "Technical Improvement and Application of Hydrodynamic Gene Delivery in Study of Liver Diseases.," *Front. Pharmacol.*, vol. 8, p. 591, Aug. 2017.
- [43] M. Tomizawa, F. Shinozaki, Y. Motoyoshi, T. Sugiyama, S. Yamamoto, and M. Sueishi, "Sonoporation: Gene transfer using ultrasound.," *World J. Methodol.*, vol. 3, no. 4, pp. 39-44, Dec. 2013.
- [44] Y. Liu, J. Yan, P. J. Santangelo, and M. R. Prausnitz, "DNA uptake, intracellular trafficking and gene transfection after ultrasound exposure," *J. Control. Release*, vol. 234, pp. 1-9, Jul. 2016.
- [45] V. M. Gaspar *et al.*, "Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy.," *J. Control. Release*, vol. 156, no. 2, pp. 212-22, Dec. 2011.
- [46] P. Naha, S. Mukherjee, and H. Byrne, "Toxicology of Engineered Nanoparticles: Focus on Poly(amidoamine) Dendrimers," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, no. 2, p. 338, Feb. 2018.
- [47] S. Agarwal, Y. Zhang, S. Maji, and A. Greiner, "PDMAEMA based gene delivery materials," *Mater. Today*, vol. 15, no. 9, pp. 388-393, Sep. 2012.
- [48] K. Karthikeyan, V. R. Krishnaswamy, R. Lakra, M. S. Kiran, and P. S. Korrapati, "Fabrication of electrospun zein nanofibers for the sustained delivery of siRNA.," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 2, p. 101, Feb. 2015.
- [49] M. Jahanshahi and Z. Babaei, "Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles," *African J. Biotechnol.*, vol. 7, no. 25, pp. 4926-4934, 2008.
- [50] S. J. Lee, J. Y. Yhee, S. H. Kim, I. C. Kwon, and K. Kim, "Biocompatible gelatin nanoparticles for tumor-targeted delivery of polymerized siRNA in tumor-bearing mice.," *J. Control. Release*, vol. 172, no. 1, pp. 358-366, Nov. 2013.
- [51] M. Karimi, P. Avci, R. Mobasser, M. R. Hamblin, and H. Naderi-Manesh, "The novel albumin-chitosan core-shell nanoparticles for gene delivery: preparation, optimization and cell uptake investigation.," *J. Nanopart. Res.*, vol. 15, no. 4, p. 1651, Apr. 2013.
- [52] L. Li, S. Puhl, L. Meinel, and O. Germershaus, "Silk fibroin layer-by-layer microcapsules for localized gene delivery.," *Biomaterials*, vol. 35, no. 27, pp. 7929-39, Sep. 2014.
- [53] M. K. Riley and W. Vermerris, "Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery-A Review.," *Nanomater. (Basel, Switzerland)*, vol. 7, no. 5, p. 94, Apr. 2017.

- [54] H. N. Yang, J. S. Park, S. Y. Jeon, W. Park, K. Na, and K.-H. Park, "The effect of quantum dot size and poly(ethylenimine) coating on the efficiency of gene delivery into human mesenchymal stem cells.," *Biomaterials*, vol. 35, no. 29, pp. 8439-49, Sep. 2014.
- [55] D. Kami *et al.*, "Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer.," *Nanomedicine*, vol. 10, no. 6, pp. 1165-74, Aug. 2014.
- [56] Z. Xu, R. Zhang, Y. Wang, and Q. Hu, "A facile approach to construct hybrid multi-shell calcium phosphate gene particles.," *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, vol. 11, no. 4, pp. 292-7, Apr. 2010.
- [57] V. Sokolova and M. Epple, "Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 47, no. 8, pp. 1382-95, Feb. 2008.
- [58] A. Rodriguez, A. Del, and M. Angeles, "Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy," in *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*, InTech, 2013, pp. 3-34.
- [59] R. Y. Pelgrift and A. J. Friedman, "Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 13-14, pp. 1803-15, Nov. 2013.
- [60] A. Rodzinski *et al.*, "Targeted and controlled anticancer drug delivery and release with magnetoelectric nanoparticles.," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 20867, Feb. 2016.
- [61] S. Hariharan, V. Bhardwaj, I. Bala, J. Sitterberg, U. Bakowsky, and M. N. V. Ravi Kumar, "Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy.," *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 1, pp. 184-95, Jan. 2006.
- [62] B. Bernocchi, R. Carpentier, I. Lantier, C. Ducournau, I. Dimier-Poisson, and D. Betbeder, "Mechanisms allowing protein delivery in nasal mucosa using NPL nanoparticles.," *J. Control. Release*, vol. 232, pp. 42-50, Jun. 2016.
- [63] D. J. Irvine, M. C. Hanson, K. Rakhra, and T. Tokatlian, "Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy.," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 19, pp. 11109-46, Oct. 2015.
- [64] R. A. Cordeiro, D. Santo, D. Farinha, A. Serra, H. Faneca, and J. F. J. Coelho, "High transfection efficiency promoted by tailor-made cationic tri-block copolymer-based nanoparticles," *Acta Biomater.*, vol. 47, pp. 113-123, Jan. 2017.
- [65] J. Chen, Z. Guo, H. Tian, and X. Chen, "Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery.," *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 3, p. 16023, 2016.
- [66] B. Dalby, "Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications," *Methods*, vol. 33, no. 2, pp. 95-103, Jun. 2004.
- [67] E. C. Ohki, M. L. Tilkins, V. C. Ciccarone, and P. J. Price, "Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons.," *J. Neurosci. Methods*, vol. 112, no. 2, pp. 95-9, Dec. 2001.

- [68] S. Cui, S. Zhang, H. Chen, B. Wang, Y. Zhao, and D. Zhi, "The Mechanism of Lipofectamine 2000 Mediated Transmembrane Gene Delivery," *Engineering*, vol. 04, no. 10, pp. 172-175, 2012.
- [69] F. Cardarelli *et al.*, "The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery.," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 25879, Sep. 2016.
- [70] J. A. O'Brien and S. C. R. Lummis, "Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 2, pp. 977-981, Aug. 2006.
- [71] S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein, and M. R. Abedi, "Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update.," *J. Gene Med.*, vol. 20, no. 5, p. e3015, May 2018.
- [72] D. A. Goldstein *et al.*, "A global comparison of the cost of patented cancer drugs in relation to global differences in wealth," *Oncotarget*, vol. 8, no. 42, Sep. 2017.
- [73] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer.," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57-70, Jan. 2000.
- [74] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation.," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646-74, Mar. 2011.
- [75] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. a Diaz, and K. W. Kinzler, "Cancer genome landscapes.," *Science*, vol. 339, no. 6127, pp. 1546-58, Mar. 2013.
- [76] M. Pelizzola and J. R. Ecker, "The DNA methylome.," *FEBS Lett.*, vol. 585, no. 13, pp. 1994-2000, Jul. 2011.
- [77] E. Toufektchan and F. Toledo, "The Guardian of the Genome Revisited: p53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure.," *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 5, p. 135, May 2018.
- [78] S. Baker *et al.*, "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas," *Science (80-.)*, vol. 244, no. 4901, pp. 217-221, Apr. 1989.
- [79] T. Takahashi *et al.*, "p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer.," *Science*, vol. 246, no. 4929, pp. 491-4, Oct. 1989.
- [80] J. F. A. Valente, J. A. Queiroz, and F. Sousa, "p53 as the Focus of Gene Therapy: Past, Present and Future.," *Curr. Drug Targets*, vol. 19, no. 15, pp. 1801-1817, Oct. 2018.
- [81] J.-P. Kruse and W. Gu, "Modes of p53 Regulation," *Cell*, vol. 137, no. 4, pp. 609-622, May 2009.
- [82] F. Chen, W. Wang, and W. S. El-Deiry, "Current strategies to target p53 in cancer.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 80, no. 5, pp. 724-30, Sep. 2010.
- [83] Q. Li and G. Lozano, "Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 34-41, Jan. 2013.

- [84] S. Lain and D. Lane, "Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53.," *Eur. J. Cancer*, vol. 39, no. 8, pp. 1053-60, May 2003.
- [85] G. Ma, H. Shimada, K. Hiroshima, Y. Tada, N. Suzuki, and M. Tagawa, "Gene medicine for cancer treatment: commercially available medicine and accumulated clinical data in China.," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 2, no. 2, pp. 115-22, Feb. 2009.
- [86] F. R. Slater, M. J. Bailey, A. J. Tett, and S. L. Turner, "Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities.," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 66, no. 1, pp. 3-13, Oct. 2008.
- [87] S. Chen, M. Larsson, R. C. Robinson, and S. L. Chen, "Direct and convenient measurement of plasmid stability in lab and clinical isolates of *E. coli.*," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 4788, Dec. 2017.
- [88] S. Khan *et al.*, "Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life.," *Int. J. Genomics*, vol. 2016, p. 2405954, 2016.
- [89] P. H. Oliveira and J. Mairhofer, "Marker-free plasmids for biotechnological applications - implications and perspectives.," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 9, pp. 539-47, Sep. 2013.
- [90] F. Silva, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues, "Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli.*," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 691-708, May 2012.
- [91] J. Brito, "Plasmid DNA production for gene therapy and therapeutic or preventive vaccination in humans: a challenge for the pharmaceutical industry," *Biotechnol. Appl.*, vol. 22, pp. 251-255, 2005.
- [92] D. L. Varley *et al.*, "Production of plasmid DNA for human gene therapy using modified alkaline cell lysis and expanded bed anion exchange chromatography.," *Bioseparation*, vol. 8, no. 1-5, pp. 209-17, 1999.
- [93] L. DONG, L.-B. LÜ, and R. LAI, "Molecular cloning of *Tupaia belangeri chinensis* neuropeptide Y and homology comparison with other analogues from primates," *Zool. Res.*, vol. 33, no. 1, pp. 75-78, Feb. 2013.
- [94] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, and D. M. F. Prazeres, "Chromatography of plasmid DNA.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1069, no. 1, pp. 3-22, Mar. 2005.
- [95] J. Stadler, R. Lemmens, and T. Nyhammar, "Plasmid DNA purification.," *J. Gene Med.*, vol. 6 Suppl 1, no. S1, pp. S54-66, Feb. 2004.
- [96] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, G. A. Monteiro, S. A. Martins, G. N. Ferreira, and D. M. Prazeres, "Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 68, no. 5, pp. 576-83, Jun. 2000.

- [97] J. Briggs and P. R. Panfili, "Quantitation of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals.," *Anal. Chem.*, vol. 63, no. 9, pp. 850-9, May 1991.
- [98] W. Doerfler, U. Hohlweg, K. Müller, R. Remus, H. Heller, and J. Hertz, "Foreign DNA integration--perturbations of the genome--oncogenesis.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 945, no. 1, pp. 276-88, Sep. 2001.
- [99] H. L. Davis, M. Schleef, P. Moritz, M. Mancini, J. Schorr, and R. G. Whalen, "Comparison of plasmid DNA preparation methods for direct gene transfer and genetic immunization.," *Biotechniques*, vol. 21, no. 1, pp. 92-4, 96-9, Jul. 1996.
- [100] D. Petsch and F. B. Anspach, "Endotoxin removal from protein solutions.," *J. Biotechnol.*, vol. 76, no. 2-3, pp. 97-119, Jan. 2000.
- [101] M. Schleef and T. Schmidt, "Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications," *J. Gene Med.*, vol. 6, no. S1, pp. S45-S53, Feb. 2004.
- [102] A. Sousa, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification.," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3046-58, Nov. 2012.
- [103] G. N. M. Ferreira, "Chromatographic Approaches in the Purification of Plasmid DNA for Therapy and Vaccination," *Chem. Eng. Technol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1285-1294, Nov. 2005.
- [104] G. N. M. Ferreira, G. A. Monteiro, D. M. F. Prazeres, and J. M. S. Cabral, "Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications.," *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 9, pp. 380-8, Sep. 2000.
- [105] L. Vinet and A. Zhedanov, "A 'missing' family of classical orthogonal polynomials," *J. Phys. A Math. Theor.*, vol. 44, no. 8, p. 085201, Feb. 2011.
- [106] O. Coskun, "Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY," *North. Clin. Istanbul*, vol. 3, no. 2, pp. 156-160, 2016.
- [107] D. M. F. Prazeres, *Plasmid Biopharmaceuticals*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [108] F. Sousa, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA.," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 9, pp. 518-25, Sep. 2008.
- [109] D. M. F. Prazeres, T. Schlupe, and C. Cooney, "Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 806, no. 1, pp. 31-45, May 1998.
- [110] C. R. Lowe, A. R. Lowe, and G. Gupta, "New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals.," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 49, no. 1-3, pp. 561-74, Oct. 2001.

- [111] M. Konishi, K. Kawamoto, M. Izumikawa, H. Kuriyama, and T. Yamashita, "Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors," *J. Gene Med.*, vol. 10, no. 6, pp. 610-618, Jun. 2008.
- [112] F. Sousa, S. Freitas, A. R. Azzoni, D. M. F. Prazeres, and J. Queiroz, "Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step.," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 45, no. Pt 3, pp. 131-40, Nov. 2006.
- [113] J. C. Murphy, D. L. Jewell, K. I. White, G. E. Fox, and R. C. Willson, "Nucleic acid separations utilizing immobilized metal affinity chromatography.," *Biotechnol. Prog.*, vol. 19, no. 3, pp. 982-6, Jun. 2003.
- [114] D. S. Hage *et al.*, "Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 69, pp. 93-105, Oct. 2012.
- [115] P. Wils *et al.*, "Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography," *Gene Ther.*, vol. 4, no. 4, pp. 323-330, Apr. 1997.
- [116] J. Woodgate, D. Palfrey, D. A. Nagel, A. V. Hine, and N. K. H. Slater, "Protein-mediated isolation of plasmid DNA by a zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 79, no. 4, pp. 450-6, Aug. 2002.
- [117] S. Ghose, G. M. Forde, and N. K. H. Slater, "Affinity adsorption of plasmid DNA.," *Biotechnol. Prog.*, vol. 20, no. 3, pp. 841-50, Jun. 2004.
- [118] S. I. S. Grewal and D. Moazed, "Heterochromatin and epigenetic control of gene expression.," *Science*, vol. 301, no. 5634, pp. 798-802, Aug. 2003.
- [119] N. M. Luscombe, R. A. Laskowski, and J. M. Thornton, "Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 13, pp. 2860-74, Jul. 2001.
- [120] S. Kanoun, L. Amourache, S. Krishnan, and M. A. Vijayalakshmi, "New support for the large-scale purification of proteins.," *J. Chromatogr.*, vol. 376, no. C, pp. 259-67, Apr. 1986.
- [121] L. F. A. Amorim *et al.*, "Chromatographic HPV-16 E6/E7 plasmid vaccine purification employing L-histidine and 1-benzyl-L-histidine affinity ligands," *Electrophoresis*, vol. 38, no. 22-23, pp. 2975-2980, Nov. 2017.
- [122] P. Tiainen, P.-E. Gustavsson, A. Ljunglöf, and P.-O. Larsson, "Superporous agarose anion exchangers for plasmid isolation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1138, no. 1-2, pp. 84-94, Jan. 2007.
- [123] J. Filipa and A. Pereira, "Affinity purification and delivery of a p53-encoding plasmid DNA for gene mediated cancer therapy," 2018.

- [124] J. Adamčík, V. Víglaský, F. Valle, M. Antalík, D. Podhradský, and G. Dietler, "Effect of bacteria growth temperature on the distribution of supercoiled DNA and its thermal stability.," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 19, pp. 3300-9, Sep. 2002.
- [125] J. Urthaler, W. Buchinger, and R. Necina, "Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy.," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 52, no. 3, pp. 703-11, 2005.
- [126] A. U. Bielinska, J. F. Kukowska-Latallo, and J. R. Baker, "The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1353, no. 2, pp. 180-90, Aug. 1997.
- [127] H. Li, H. Bo, J. Wang, H. Shao, and S. Huang, "Separation of supercoiled from open circular forms of plasmid DNA, and biological activity detection," *Cytotechnology*, vol. 63, no. 1, pp. 7-12, Jan. 2011.
- [128] D. M. . Prazeres, G. . Monteiro, G. N. . Ferreira, M. . Diogo, S. . Ribeiro, and J. M. . Cabral, "Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination," in *Biotechnology Annual Review*, vol. 7, 2001, pp. 1-30.
- [129] F. Sousa, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Circular dichroism investigation of the effect of plasmid DNA structure on retention in histidine chromatography," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 467, no. 2, pp. 154-162, Nov. 2007.
- [130] S. Kundu, S. Mukherjee, and D. Bhattacharyya, "Effect of temperature on DNA double helix: An insight from molecular dynamics simulation," *J. Biosci.*, vol. 37, no. 3, pp. 445-455, Jul. 2012.
- [131] J. M. Davis, "Critique of single amine theories: evidence of a cholinergic influence in the major mental illnesses.," *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, vol. 54, no. 8, pp. 333-46, Feb. 1975.
- [132] É. Mota, Â. Sousa, U. Černigoj, J. A. Queiroz, C. T. Tomaz, and F. Sousa, "Rapid quantification of supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid using a monolithic ion exchanger," *J. Chromatogr. A*, vol. 1291, pp. 114-121, May 2013.
- [133] P. K. Smith *et al.*, "Measurement of protein using bicinchoninic acid.," *Anal. Biochem.*, vol. 150, no. 1, pp. 76-85, Oct. 1985.
- [134] L. Vinet and A. Zhedanov, "A 'missing' family of classical orthogonal polynomials," *Subcell. Biochem.*, vol. 53, no. 8, pp. 187-208, Nov. 2010.
- [135] N. J. Greenfield, "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure.," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 6, pp. 2876-90, Dec. 2006.
- [136] A. B. Westbye, J. T. Beatty, and A. S. Lang, "Guaranteeing a captive audience: coordinated regulation of gene transfer agent (GTA) production and recipient capability by cellular regulators," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 38, pp. 122-129, Aug. 2017.

- [137] N. Nagao *et al.*, “The gene transfer agent-like particle of the marine phototrophic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*,” *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 4, pp. 369-374, Dec. 2015.
- [138] S. Masuda *et al.*, “Whole-Genome Sequence of the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* Strain W4.,” *Genome Announc.*, vol. 1, no. 4, Aug. 2013.
- [139] M. Camps, “Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression.,” *Recent Pat. DNA Gene Seq.*, vol. 4, no. 1, pp. 58-73, Jan. 2010.
- [140] J. M. Halstead *et al.*, “An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals,” *Science (80-.)*, vol. 347, no. 6228, pp. 1367-1671, Mar. 2015.
- [141] T. Ando, H. Suzuki, K. Komura, T. Tanaka, A. Hiraishi, and Y. Kikuchi, “Extracellular RNAs produced by a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*.,” *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*, vol. 139, no. 48, pp. 165-6, Apr. 2004.
- [142] A. Jungbauer, “Chromatographic media for bioseparation.,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1065, no. 1, pp. 3-12, Feb. 2005.
- [143] N. R. Deshmukh and A. M. Lali, “Adsorptive purification of pDNA on superporous rigid cross-linked cellulose matrix,” *J. Chromatogr. B*, vol. 818, no. 1, pp. 5-10, Apr. 2005.
- [144] F. Sousa, C. T. Tomaz, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, “Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support,” *Anal. Biochem.*, vol. 343, no. 1, pp. 183-185, Aug. 2005.
- [145] M. M. Hoffman, “AANT: the Amino Acid-Nucleotide Interaction Database,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 90001, p. 174D-181, Jan. 2004.
- [146] A. Soares, J. A. Queiroz, F. Sousa, and A. Sousa, “Purification of human papillomavirus 16 E6/E7 plasmid deoxyribonucleic acid-based vaccine using an arginine modified monolithic support.,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1320, pp. 72-9, Dec. 2013.
- [147] D. Kozakov, R. Brenke, S. Comeau, and S. Vajda, “PIPER: An FFT-based Protein Docking Program with Pairwise Potentials,” *Proteins*, vol. 66, no. 4, pp. 903-11, May 2006.
- [148] A. R. Silva-Santos, C. P. A. Alves, D. M. F. Prazeres, and A. M. Azevedo, “A process for supercoiled plasmid DNA purification based on multimodal chromatography,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 182, pp. 94-100, Jul. 2017.
- [149] F. Sousa, T. Matos, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, “Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography.,” *Anal. Biochem.*, vol. 374, no. 2, pp. 432-4, Mar. 2008.
- [150] T. Thomas *et al.*, “Effects of natural and synthetic polyamines on the conformation of an oligodeoxyribonucleotide with the estrogen response element.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, no. 12, pp. 2396-402, Jun. 1997.

- [151] Â. Sousa, P. Pereira, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Binding mechanisms for histamine and agmatine ligands in plasmid deoxyribonucleic acid purifications," *J. Chromatogr. A*, vol. 1366, pp. 110-119, Oct. 2014.
- [152] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, G. A. Monteiro, and D. M. Prazeres, "Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography.," *Anal. Biochem.*, vol. 275, no. 1, pp. 122-4, Nov. 1999.
- [153] I. Kejnovská, J. Kypr, and M. Vorlíčková, "Circular dichroism spectroscopy of conformers of (guanine + adenine) repeat strands of DNA," *Chirality*, vol. 15, no. 7, pp. 584-592, Aug. 2003.
- [154] R. D. Nolker and L. Zhou, "Social Computing and Weighting to Identify Member Roles in Online Communities," in *The 2005 IEEE/WIC/ACM International Conference on Web Intelligence (WI'05)*, 2014, pp. 87-93.
- [155] H. P. Fernandes, C. L. Cesar, and M. de L. Barjas-Castro, "Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation.," *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, vol. 33, no. 4, pp. 297-301, 2011.
- [156] M. Gumustas, C. T. Sengel-Turk, A. Gumustas, S. A. Ozkan, and B. Uslu, "Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems," in *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, Elsevier, 2017, pp. 67-108.
- [157] G. W. Lu and P. Gao, "Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery," in *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, Elsevier, 2010, pp. 59-94.
- [158] J. F. A. Valente, A. Sousa, V. M. Gaspar, J. A. Queiroz, and F. Sousa, "The biological performance of purified supercoiled p53 plasmid DNA in different cancer cell lines," *Process Biochem.*, vol. 75, pp. 240-249, Dec. 2018.
- [159] J. S. Bertram, "The molecular biology of cancer.," *Mol. Aspects Med.*, vol. 21, no. 6, pp. 167-223, Dec. 2000.
- [160] B. P. Lucey, W. A. Nelson-Rees, and G. M. Hutchins, "Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination.," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 133, no. 9, pp. 1463-7, Sep. 2009.
- [161] J. J. M. Landry *et al.*, "The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line.," *G3 (Bethesda)*, vol. 3, no. 8, pp. 1213-24, Aug. 2013.

Anexo I

Effect of chromatographic conditions on supercoiled plasmid DNA stability and bioactivity

G.M. Azevedo¹, J.F.A. Valente^{1,2}, A. Sousa¹, A.Q. Pedro³, P. Pereira¹, F. Sousa^{1,*}, J.A. Queiroz¹

¹CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

²CDRSP - Centre for Rapid and Sustainable Product Development, Polytechnic Institute of Leiria, Leiria, Portugal

³CICECO - Aveiro Institute of Materials, Chemistry Department, University of Aveiro, Aveiro, Portugal

***Corresponding Author**

Name: Fani Sousa

Address: Av. Infante D. Henrique 6200-506 Covilhã, Portugal

Telephone: 00351 275 329 074

Fax: 00351 275329099

Email: fani.sousa@fcsaude.ubi.pt

Abstract

The dysfunction of the tumour suppressor gene TP53, has been associated with the pathogenesis of the majority of the cases of cancer reported up to the date, leading the cell to acquire different features, known as the cancer hallmarks. In normal situations, the protein p53 protects the cells against tumorigenesis detecting metabolic stress or DNA damage in response to stress, p53 can lead the cell to senescence, autophagy, cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis. Thus, in case of p53 mutations, it is reasonable to assume that the reestablishment of its function, may restrain the proliferation of cancer cells. The concept of cancer gene therapy can be based on this assumption, and suitable biotechnological approaches must be explored to assure the preparation of gene-based biopharmaceuticals. Although numerous procedures have already been established to purify supercoiled plasmid DNA (sc pDNA), the therapeutic application is highly dependent on the biopharmaceutical's activity, which can be affected by the chromatographic conditions used. Thus, the present work aims at comparing quality and *in vitro* activity of the supercoiled (sc) isoform of pcDNA3-FLAG-p53 purified by three different amino acids-based chromatographic strategies, involving histidine-agarose, arginine-macroporous and histidine-monolith supports. The B-DNA topology was maintained in all purified pDNA samples, but their bioactivity, related with the induction of protein p53 expression and apoptosis in cancer cells, was higher with arginine-macroporous support, followed by histidine-monolith and histidine-agarose. Despite of the purity degree of 92% and recovery yield of 43% obtained with arginine-macroporous, the sc pDNA sample led to a higher expression level of the therapeutic p53 protein (58%) and, consequently, induced a slightly higher apoptotic effect (27%) compared with sc pDNA samples obtained with Histidine-monolithic support (26%) and Histidine-agarose support (24%). This behavior can be related to the mild chromatographic conditions used with arginine-macroporous support, which include the use of low salt concentrations, at neutral pH and lower temperatures, when compared to the high ionic strength of ammonium sulphate and acidic pH used with histidine-based supports. These results can contribute to field of biopharmaceuticals' preparation, emphasizing the need to control several experimental conditions, while adapting and selecting the methodologies that enable the use of milder conditions as this can have a significant impact on pDNA stability and biological activity.

Keywords: Affinity chromatography, chromatographic conditions, p53 encoding plasmid, supercoiled pDNA bioactivity, gene-based cancer therapy.

1. Introduction

Up to date more than 200 types cancer have been described and characterized, and in all these cases, changes in the genome are involved, proving the complexity of this disease [1,2]. When some mutations occur and are accumulated, the tumorigenesis process can start, leading the cell to gain different characteristics, namely: self-sufficiency in growth signals, insensitivity to antigrowth signals, sustained angiogenesis, capacity of invasion and metastasis, limitless replicative potential and evasion of programmed cell death (apoptosis) [2]. The DNA mutations can occur not only by abiotic factors, such as environment exposure, but also could happen due to biotic factors, such as DNA replication errors or virus infection [3]. Cells have tumour suppressor genes that are responsible for the inhibition of cell growth and/or induction of cellular apoptosis, which therefore prevent cancer development. Amongst all the tumour suppressor genes, one of the most important/relevant is the *p53*, once different research studies demonstrated that it is mutated or deleted in more than 50% of all human cancers [4,5]. In response to stress, *p53* can induce cell senescence, autophagy, cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis [6]. Concerning this, the *p53* gene has attracted much attention as a candidate to be applied for cancer gene therapy, since the replacement of the abnormal gene by the normal counterpart, could restore the protective function of the cell guardian. The manufacturing process of therapeutic molecules to be used in gene therapy encompasses an initial upstream stage foreseeing the production of this biomolecule by bacterial fermentation and a downstream stage comprising the its recovery and purification, usually based on chromatography, aiming the removal of host´s impurities, ensuring at the end of the process a high degree of purity of the purified sc pDNA according some parameters established by regulatory agencies, such as the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicine Agency (EMA). [7,8]. Among these parameters, are included the product appearance (clear, colourless solution), the plasmid homogeneity [$\geq 90\%$ supercoiled (sc) pDNA] and impurities levels [RNA and proteins should be undetectable, the amount of genomic DNA (gDNA) must be lower than $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ of pDNA and the level of endotoxins should not be higher than $0.1 \text{ EU}/\mu\text{g}$ of pDNA] [9]. All these impurities are derived from bacteria host cells used in the biosynthesis of plasmid and share some physicochemical characteristics with the target molecule, namely negative charge and molecular weight, which may hinder the pDNA purification [2]. Each impurity can promote some adverse effects on human cells, for example, gDNA can integrate on cell genome suppressing genes or even activating oncogenes [10], while the silencing of some cellular products can occur by bacterium RNA pairing with the messenger RNA of transfected cells. Moreover, endotoxins exhibit pyrogenic activities and may promote irreversible septic shock [11], as bacterial proteins can trigger several immunological responses, even if they are present in small amounts [12]. The need to obtain the sc pDNA topology is also related with its effectiveness in cell transfection and product expression, in comparison to other isoforms [open circular (oc) and linear (ln)]. To purify the target molecule, following all requirements of regulatory agencies, affinity chromatography has shown to be a useful tool, mainly because of its ability to promote multiple reversible and specific interactions between biomolecules and the ligands [13]. However, the chromatographic conditions used to bind and elute the target molecule, also can irreversibly influence the plasmid stability, reducing its bioactivity or even making the therapeutic gene function unfeasible. In this way, it should be remarked the importance of the salt effect (type and ionic strength applied) once it can induce changes in DNA conformation. In fact, The literature reports that some kinds of salts are more effective than other in dehydrating the DNA by displacing water molecules from the hydration layer which can promotes the binding or elution between of the target molecule and matrices [9]. Also the pH of buffer used on the mobile phase also plays an important role and should be carefully adjusted in order to maintain the ideal ionization point, both in

ligands and lysate molecules, for the successful separation on chromatography. The depurination is the main problem associated to this parameter, which may cause irreversible damage on DNA structure [9,14]. Finally, temperature can weaken or even disrupt the hydrogen bonds established between base pairs, also influencing the torsion of the pDNA molecule, mainly in the sc pDNA isoform [15]. Thus, the adjustment of all parameters can promote the best purification methodology, attaining high pharmaceutical purity degree and high recovery yield for the target molecule without compromising its bioactivity, which represents the major barrier to be overcome on the pharmaceutical industry. In this context, this research work is focused on the study of the effect of different chromatographic conditions (such as salt type and concentration, pH and temperature) on the stability and bioactivity of the recovered sc p53 encoding plasmid. To achieve this goal, the effect of these parameters were evaluated on the samples purified by three different chromatographic supports, namely histidine-agarose, arginine-macroporous and histidine-monolith. Beside the quality assays used to check the purity degree of sc pDNA, the topology of supercoiled also evaluated by circular dichroism, zeta potential of samples in the buffer was measured and finally the bioactivity of therapeutic molecule suggest us about the most appropriate strategy used in this work, in function of expression of p53 and apoptosis of cell.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The 6.07 kbp pcDNA3-FLAG-p53 plasmid was purchased from Addgene (Cambridge, MA, USA - plasmid 10838) [16]. The NZYtech Maxi Prep Kit was purchased from NZYTech (Lisbon, Portugal). L-histidine-agarose matrix was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). CIMac™ L-histidine analytical column was kindly modified and provided by BIA Separations (Ajdovščina, Slovenia). Toyopearl® AF-Epoxy-650M was kindly provided by Tosoh Bioscience (Stuttgart, Germany). Sodium chloride (NaCl) was purchased to Sigma- Aldrich, ammonium sulphate [(NH₄)₂SO₄] was purchased from VWR, tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) was from Merck (Darmstadt, Germany). EDTA was purchased to VWR (Alfragide, Portugal). Binding and elution buffers were filtered through a 0.20 µm pore size membrane (Schleicher Schuell, Dassel, Germany) and degassed ultrasonically. HeLa cells were purchased from ATCC (Middlesex, UK), the transfection reagent Lipofectamine 2000® was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). p53 (human) ELISA kit was purchased to Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA). HT TiterTACSTM Assay Kit was purchased from Trevigen, Inc. (Gaithersburg, CA). All the reagents used in bacterial growth were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All reagents used in this work were analytical grade and the buffers were freshly prepared with deionized ultrapure-grade water, purified with a Milli-Q system from Millipore (Billerica, MA, USA).

2.2 Plasmid biosynthesis and recovery

The 6.07 kbp plasmid pcDNA3-FLAG-p53 was amplified in a *Escherichia Coli* (*E. coli*) DH5a cell culture at 37 °C in an Erlenmeyer with 250 mL of Terrific Broth medium (20 g/L of tryptone, 24 g/L of yeast extract, 4 mL/L of glycerol, 0.017 M KH₂PO₄, 0.072 M K₂HPO₄) supplemented with 30 µg/mL of ampicillin. The cells were grown until the late log phase (OD_{600nm} ± 9), and then were collected by centrifugation and stored at -20 °C. For the recovery of nucleic acids, cells were lysed using the modified alkaline lysis method [17,18]. Briefly, cell pellets were resuspended in 10 mL of solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl and 10 mM ethylene-diamine tetra acetic acid (EDTA), pH 8.0). Alkaline lysis was performed by adding 10 mL of solution II (200 mM NaOH and 1% (w/v) sodium dodecyl sulphate). After 5 min of incubation at room temperature, cellular debris, gDNA and proteins were precipitated by gently adding and mixing 10 mL of

prechilled solution III (3 M potassium acetate, pH 5.0), followed by 20 min incubation on ice. Cellular debris was removed by centrifuging twice at 20000 g for 30 min, at 4 °C. For the concentration and clarification [18], the pDNA in the supernatant was precipitated by adding 0.7 (v/v) of isopropanol and recovered by centrifugation at 15000 g for 30 min at 4 °C. The pellets were then dissolved in 2 mL of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. In the next step, ammonium sulphate was dissolved in the pDNA solution up to a final concentration of 2.5 M. Following a 15 min incubation on ice, precipitated proteins and RNA were removed by centrifugation at 10000 g for 20 min at 4 °C. To obtain the native pDNA (oc + sc) the NZYtech Maxi Prep Kit was used, according to the manufacturer's instructions.

2.3 Preparative chromatography

All chromatographic experiments were performed in an ÄKTA Pure system with UNICORN™ version 5.11 software (GE Healthcare Biosciences Uppsala, Sweden) and absorbance was continuously monitored at 260 nm. The flow rate used was of 1 mL/min and the sample injection volume was of 100 µL in the case of arginine-macroporous support and histidine-monolith and of 200 µL in the case of histidine-agarose matrix. After chromatographic experiments, samples were desalted and concentrated with Vivaspin concentrators (Vivascience, Hanover, Germany) according to the manufacturer's instructions. Moreover, 0.8% agarose gel electrophoresis (Hoefer, San Francisco, CA, USA), stained with GreenSafe Premium (0.01%) (NZYTech, Lisbon, Portugal), was performed to analyse the peak fractions recovered from the chromatographic experiments. Electrophoresis was carried out at 110 V with TAE buffer (40 mM Tris base, 20 mM acetic acid and 1mM EDTA, pH 8.0). The gel was visualized under UV light in a Vilber Lourmat system (ILC Lda, Lisbon, Portugal).

2.3.1 Histidine-agarose support

In the case of the L-histidine-agarose matrix, a column with 16 x 30 mm (about 6 mL) was packed. The water jacketed column was connected to a circulating water bath to maintain the appropriate temperature at 4 °C. The column was equilibrated with 2.3 M (NH₄)₂SO₄ in 10 mM Tris buffer, pH 8.0. The elution was carried out using a 60 min linear gradient decreasing the ionic strength of the buffer to 1.7 M (NH₄)₂SO₄ in 10 mM Tris buffer, pH 8.0 and finally, tightly bound molecules were removed by changing to salt-free 10 mM Tris buffer, pH 8.0.

2.3.2 Arginine-macroporous support

The commercial support Toyopearl Epoxy was modified with amino acid arginine as ligand, following the method described in the literature [19]. After being synthesized, the arginine-macroporous matrix was packed on the chromatographic column 10 x 20 mm (about 1.6 mL). The water jacketed column was connected to a circulating water bath to maintain the appropriate temperature at 5 °C. Before injection, the sample was desalted using a PD10 column. The arginine-macroporous column was equilibrated with 96 mM of NaCl in 10 mM Tris buffer (pH 8.0) and then the ionic strength was increased to 500 mM and, finally to 2 M of NaCl, to sequentially elute the bound species.

2.3.3 Histidine-monolithic support

These assays were carried out in a CIMac™ L-histidine analytical column with 0.1 mL bed volume, provided by BIA Separations (Ajdovščina, Slovenia). Monolith was equilibrated with 3 M (NH₄)₂SO₄ in 10 mM citrate-EDTA buffer, pH 5.0. The lysate sample was injected after adjusting the ionic strength and then a stepwise gradient was applied, first decreasing the salt concentration to 2.52 M and, finally to 0 M (NH₄)₂SO₄ in 10

mM citrate-EDTA buffer, pH 5.0. These chromatographic experiments were performed at room temperature.

2.4 Quality assessment of purified pDNA

2.4.1 Plasmid quantification by analytical chromatography

The purity and recovery yield of the sc pDNA was evaluated by an analytical method based on ion exchange chromatography using the commercial analytical monolith CIMac™ (BIA Separations) and as previously described [20]. To use this method, a calibration curve was first constructed in the pDNA concentration range of 1-25 µg/mL, by considering the peak area corresponding to sc pDNA standards. The recovery yield was calculated by the ratio between the obtained sc pDNA concentration and the sc pDNA concentration present in the lysate sample, while purity was calculated by the ratio between sc pDNA peak area and total peak area present in the analytic chromatogram.

2.4.2 Proteins, Endotoxins and Genomic DNA Quantification

The total protein content in purified pDNA samples was determined resorting the micro-BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit from Pierce (Rockford, IL, USA) following the manufacture's recommendations. The calibration curve was performed with the standard bovine serum albumin (0.01-0.1 mg/mL) diluted in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 or in 10 mM of Sodium Citrate buffer, pH 5.0. To evaluate the endotoxins levels, a ToxiSensor™ Chromogenic *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL) kit (GenScript, USA) was applied, in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, a calibration curve was performed (from 0.005 to 0.1 EU/mL) using a stock solution of 8 EU/mL. To avoid the external endotoxin interference, all the samples were diluted or dissolved in non-pyrogenic water, which was also used as the blank. All the tubes and tips used to perform this analysis were endotoxins-free. All the procedure was performed inside of a laminar flow cabinet to assure aseptic conditions. *Quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) was applied to quantify the amount of gDNA in the purified pDNA samples. To accomplish this analysis a iQ5 Multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad) was used, as previously described [21]. To perform it, primers able to amplify a 181-bp fragment of the 16S rRNA gene (sense (5'-ACACGGTCCA GAACTCCTACG-3') and antisense (5'-CCGGTGCTTCTTCTGCGGGT AACGTCA-3') were used. Moreover, for the gDNA quantification in lysate samples, a 100-fold dilution was prepared. The PCR amplicons were quantified by following the change in fluorescence of the DNA binding dye Syber Green (Bio-Rad). Nonetheless, a calibration curve performed through consecutive dilutions of the purified *E. coli* DH5a gDNA in the 0.005 to 50 ng/µL range was obtained to measure the concentration of the gDNA obtained. Negative controls (no template) were run at the same time of each analysis.

2.5 Structural analysis of pDNA

2.5.1 Circular Dichroism

The topology of pDNA samples (100 µg/mL) purified by each chromatographic strategy was evaluated by a Jasco J-1850 Spectrophotometer (Jasco, Easton, MD, EUA) with a rectangular quartz cell (Hellman analysis, Germany) and an optical path of 1 mm. The spectra were obtained at a scanning speed of 10 nm/min, in an absorbance range between 320-210 nm and a spectral bandwidth of 1 nm. All assays were performed under a constant flow of nitrogen, thereby purging the ozone that is generated by the light source (xenon lamp) of the equipment. Data were collected in triplicate (n=3) and the means represented in a single spectrum. At the end of each run, the noise was removed using the Jasco J1850 Software to obtain a more linear spectrum without distortion of the peaks of the positive (270 and 220 nm) and negative (245 nm) bands, characteristic of the pDNA.

2.5.2 Zeta Potential

The equipment Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) was used to evaluate the superficial density of charge of pDNA in disposable capillary cells at 25 °C. The value of zeta potential was calculated using the models of Henry [F (Ka) 1.5] and Smoluchowsky. The mean values of the zeta potential measurements were calculated from the data obtained from three replicates \pm SD.

2.6 Bioactivity of pDNA

2.6.1 Cell culture and transfection

Cell culture experiments were performed with the HeLa cervix cancer cell line and the non-malignant cell line, human dermal Fibroblasts. Cells were cultured in DMEM-F12 medium supplemented with 10% (v/v) heat activated FBS and streptomycin (100 μ g/mL) at 37 °C, under a 5% CO₂ humidified atmosphere. *In vitro* transfection experiments were carried out by seeding 1×10^4 cells in a 96 well plate with 200 μ L of DMEM-F12 complete medium and incubated for 24 h. Afterwards, the complete medium was replaced by DMEM-F12 medium without FBS and without antibiotic, in order to promote transfection. The transfection of cells with the purified pDNA obtained from the different chromatographic strategies was performed with a commercially available transfection reagent (Lipofectamine 2000 (Lipo2000)). Briefly, in each well of the 96-wells plate, 0.28 μ L of Lipo2000 and 0.14 μ g of pDNA were diluted in 5.15 μ L of Opti-MEM® I medium, according to the supplier protocol. Before the complexation reaction, Lipo2000-pDNA complexes were incubated for 5 min at room temperature and then added to cells. Cells were incubated for a period of 6 h after which the medium was exchanged to DMEM-F12 complete medium.

2.6.2 Cytotoxicity assays

The cytotoxicity of liposomal-pDNA formulations was evaluated by using the resazurin assay (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). For this evaluation, HeLa and human dermal Fibroblasts cells were seeded in 96-well plates, as described above. Two days after transfection, 10 μ L of resazurin (2.5 mM) was added to each well and incubated for 4 h, at 37 °C, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and in the dark. Non-transfected cells were used as negative controls for cytotoxicity (K-), and ethanol treated cells were used as positive controls (K+). Following incubation, the resulting resofurin was quantified by using a plate reader spectrofluorometer (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices LLC, US), at an excitation/emission wavelength of λ_{ex} = 560 nm and λ_{em} = 590 nm. Data represents the mean of three independent experiments.

2.6.3 p53 expression and quantification

The p53 ELISA kit Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) was employed to quantify the p53 protein expression after cells transfection with purified p53-pDNA vector. Briefly, after transfection with the different pDNA samples, HeLa and human dermal Fibroblasts cells were rinsed with ice-cold PBS and homogenized in cell lysis buffer: 25mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 2.5mM EDTA; 1% Triton X-100; 2.5mM EGTA; 25mM phenylmethylsulfonyl fluoride and complete, EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). Cell extracts were then centrifuged at 11500rpm for 7min at 4 °C and the supernatant was analysed using Bradford Protein Assay (BioRad, Hercules, CA, USA), according to the supplier's instructions. Then, the protocol supplied by Enzo life Sciences for the ELISA was applied and the p53 protein expression was measured in a plate reader spectrofluorometer (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices LLC, US), using an absorbance of 450 nm. Data represent the mean of two independent experiments.

2.6.4 p53 mediated apoptosis in malignant cells

The apoptotic process was evaluated measuring the DNA fragmentation of the HeLa cancer cells due to the endonuclease activity. To perform this experiment, 1×10^4 HeLa cells were seeded in a 96 well plate. After 48 h following transfection, the plate was centrifuged at 1000 g during 3 min at room temperature and then, the cell culture medium was discharged and, the cells were rinsed with PBS and fixed with a paraformaldehyde solution (7 min). Following, samples were incubated 20 min at room temperature with 100% methanol. The number of apoptotic cells was measured using an *in situ* colorimetric method HT TiterTACS™ Assay (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Finally, the obtained results were measured in a plate reader using an absorbance of 450 nm. Non-transfected cells were used as negative control and the positive control was performed with cells treated with an endonuclease solution provided by the kit supplier. Data represent the mean of three independent experiments.

2.6.5 Statistical analysis

Each experience was performed at least two or three times. Data are expressed as a mean \pm standard error (S.D.). The statistical analysis performed was one-way analysis of variance (ANOVA), followed by multiple comparison test Turkey. A p-value below 0.05 was considered statistically significant. Data analysis and statistical tests were performed in GraphPad Prism 6 software.

3. Results and discussion

3.1 Preparative chromatography

The clarification procedure performed after cell lysis enables the preparation of an extract enriched in sc pDNA and simultaneously promotes the reduction of the impurities content, although it is not possible to fully eliminate species such as RNA, gDNA, endotoxins or host proteins. Therefore, affinity chromatography using amino acids as ligands has been extensively used by our research group to obtain a final pDNA sample fulfilling the requirements of regulatory agencies [22-24]. Of all the amino acids studied, arginine and histidine have shown to be the most promising chromatographic ligands, allowing the purification of different plasmids with high recovery yield and purity degree [24,25]. In the present study, the selection of these amino acids was also performed because they present completely different chromatographic behaviours for the isolation of sc pDNA. In fact, through the literature, it is possible to conclude that although multiple interactions occur between the nucleic acids and these amino acids, the main interactions established with arginine are ionic interactions, while the histidine ligand mainly promotes hydrophobic interactions. This information will influence the choice of the type of salt and gradient to be applied but other parameters such as temperature or pH are crucial to establish the ideal conditions for sc pDNA purification while ensuring its stability. In this way, the main goal of this study is to understand how different chromatographic approaches influence the bioactivity of the recovered sc pDNA. Initially, three different supports were applied for the isolation and purification of sc p53 encoding pDNA, according to the optimized strategies described in Figure 1.

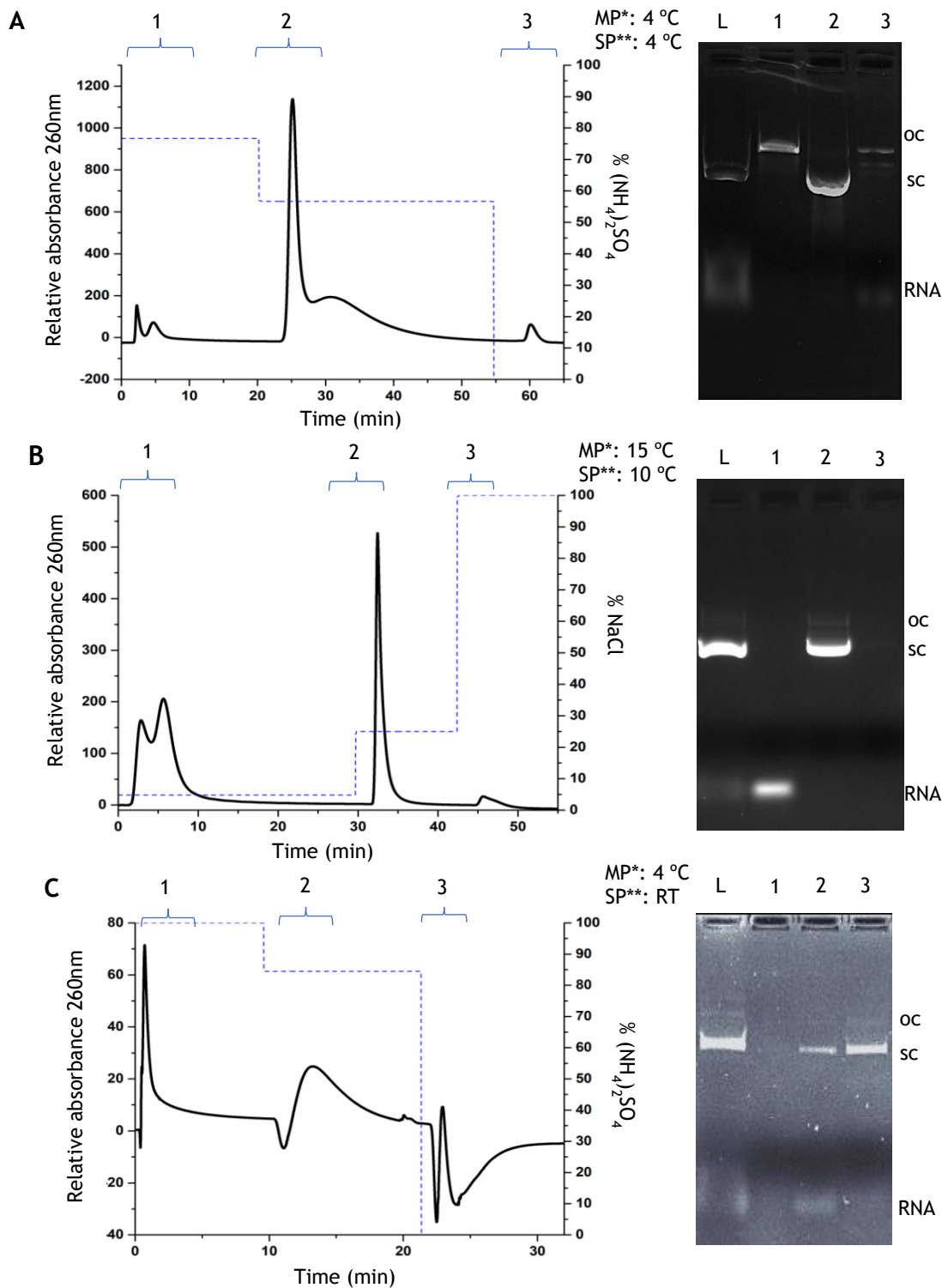


Figure 1. Chromatographic profiles and respective agarose gel electrophoresis of the p53-pDNA purification from an *E. coli* lysate using different chromatographic supports. A) Histidine-agarose matrix: the elution was performed by a decreasing stepwise gradient of 2.3 M of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, then 1.7 M of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the same buffer and finally 10 mM Tris-HCl pH 8.0; B) Arginine-macroporous support: using an increasing stepwise gradient of 124 mM of NaCl in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, then 500 mM of NaCl in the same buffer and finally 2 M of NaCl in Tris-HCl pH 8.0; C) Histidine-monolith: in this support it was used 3 M of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 10 mM citrate-EDTA, pH 5.0, then 2.52 M of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the same buffer and finally 10 mM citrate-EDTA, pH 5.0. In the agarose gel electrophoresis, lane L represents the lysate, and lanes 1, 2, and 3 represent the first, second, and third peaks of the respective chromatogram. M.P*: Mobile phase; S.P***: Stationary phase; RT: Room Temperature.

It is possible to observe the difference on the binding behaviour represented on the three chromatographic profiles. The histidine-agarose support was used to purify the sc pDNA from the clarified lysate sample by a decreasing stepwise gradient of ammonium sulphate (Fig. 1A). The oc pDNA isoform was eluted in peak 1 with 2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), as it can be visualised in lane 1 of the agarose gel electrophoresis (Fig. 1A). The sc pDNA isoform was eluted in the second peak, at 1.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (lane 2 of agarose electrophoresis - Fig. 1A), and finally, the third peak corresponds to the elution of more strongly bound molecules, recovered with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), as observed in lane 3 of the agarose gel electrophoresis, by the presence of RNA and small amounts of other molecular species (Fig. 1A). The dominant interactions responsible for the nucleic acids binding behaviour on this column are the hydrophobic ones, since the imidazole ring is able to promote interactions with nitrogenous bases of nucleic acids, by the influence of high ionic strength on the mobile phase. The hydrophobic interactions are favoured by the use of high $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations, since the kosmotropic ions influence the exposure of hydrophobic regions of molecules [26]. Considering the pDNA isoforms, sc pDNA has some hydrophobic regions, naturally exposed because of its conformational torsions [27], and this effect can be enhanced under high $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations, allowing the establishment of hydrophobic interactions between non-polar regions of the ligands and the sc pDNA. On the other hand, the oc isoform has the bases inward and they are less available to interact with histidine even in the concentration of 2.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, being immediately eluted in the first step. Concerning RNA, the bases are more exposed because of its main single-stranded nature, being in this way more available to interact with the matrix. The decrease of the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration increases the reorganization of water molecules, consequently minimizing the hydrophobic effects, and disfavoring these interactions. Despite the dominant effect of ring stacking/hydrophobic interactions, the water-mediated hydrogen bonds and van der Waals forces are also present between histidine-agarose matrix and pDNA [28,29], evidencing the affinity character of this matrix. The results obtained in Fig. 1A, are in accordance with other works, made at the same conditions but using other plasmids [24,23].

The Fig. 1B exhibits the chromatographic profile of the clarified lysate in arginine-macroporous support, as well as the respective agarose gel electrophoresis. Here, an increasing gradient of NaCl was used to elute the bound molecules. First, RNA was eluted in peak 1 at 124 mM NaCl in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), as confirmed by the agarose gel electrophoresis (lane 1, Fig. 1B). The sc pDNA isoform was then eluted in peak 2, at 500 mM NaCl, together with a small amount of oc pDNA (lane 2 Fig. 1B). A final step of 2 M NaCl was used to confirm the elution of all retained species. The arginine ligands immobilized in macroporous support, under the influence of mobile phase, mainly promote electrostatic interactions, not disregarding the involvement of other non-covalent interactions occurring between the lysate molecules and the arginine ligand [21,23]. The negatively charged groups in pDNA backbone interact with the positive groups of the arginine support, and as expected these molecules bind more strongly than RNA, because pDNA has a double stranded negatively charged chain, while RNA is smaller and presents a single-stranded nature [28,29].

The histidine-monolithic support was applied to purify the sc pDNA from the clarified lysate sample by using a decreasing stepwise gradient of ammonium sulphate (fig. 1C). The first step was established at 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 10 mM citrate-EDTA buffer, pH 5.0, to promote the retention of all biomolecules present on the monolithic column. The RNA and a small fraction of sc pDNA were eluted in the second gradient step (peak 2) at 2.52 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, as it can be observed in the agarose gel electrophoresis (lane 2, Fig. 1C). Finally, the more tightly bound biomolecules were eluted in the third peak by a decrease in the ionic strength to 10 mM Tris HCl (pH 8), which correspond to sc pDNA as visualized in lane 3 of the agarose gel

electrophoresis (FIG. 1C). In this particular case, due to the pH 5 of the mobile phase, the imidazole ring of histidine is protonated and hence positively charged, which favours the establishment of electrostatic interactions between nucleic acids and the stationary phase, in addition to the hydrophobic effects previously discussed. Actually, the difference on the chromatographic elution behaviour found on the histidine-monolith and the histidine-agarose, can be related with the additional electrostatic effect resultant from the pH 5.0 used in this study, as it was already observed by Amorim and co-workers to purify the HPV-16 E6/E7 pDNA [25].

Plasmid purification by chromatography deals with some concerns associated to the diversity of biomolecules present in the lysate extracts and their characteristics such as, size, shape, conformation, and rheological properties. Moreover, most of impurities like RNA, gDNA or endotoxins, share with pDNA some properties of molecular mass, charge or hydrophobicity [30]. Thus, the applied chromatographic methods must guarantee the presence of a final sc pDNA sample with the purity degree in accordance with the regulatory agency requirements (Table 1). Nonetheless, the residual amounts of proteins, gDNA, and endotoxins also need to be quantified to ensure that these values are in accordance with these specifications of the regulatory agencies. To accomplish that, several specific analyses were performed in the purified sc pDNA fractions and the observed results are presented in Table 1.

Table 1. Purity analysis of the purified sample of sc p53 encoding pDNA.

Parameters	Chromatographic Support			Reference values [9]
	Histidine- agarose	Arginine- macroporous	Histidine- monolith	
Proteins ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Undetectable	Undetectable	Undetectable	Undetectable
RNA	Undetectable	Undetectable	Undetectable	Undetectable
Endotoxins (EU/ μg pDNA)	0.010	0.014	0.652	< 0.1 EU/ μg pDNA
Genomic DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ pDNA)	0.0008	0.0063	0.0009	< 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ pDNA
Purity	97%	92%	100%	>90% of sc pDNA
Recovery	42%	43%	71.6%	Not applicable

Regarding the overall quality of purified sc pDNA fractions, it should be remarked that all samples were colourless and both proteins and RNA were undetectable. The endotoxins content was also quantified by the LAL method that revealed the reduction of this impurity to acceptable levels when the sc pDNA was purified by histidine-agarose and arginine-macroporous supports. However, the sc pDNA purified through the histidine-monolithic support presented a slightly higher content of endotoxins (Table 1), resulting in a value above the limit established by the regulatory agencies. Endotoxins are part of the cell wall constitution of the host and as mentioned above, must be removed from the lysate, being acceptable only at minimal amounts (<0.1 EU/ μg pDNA), because they exhibit pyrogenic activity when they are present in high doses [11]. The amphipathic feature of endotoxins, makes the process of eliminating this component more difficult [31]. Actually, some authors have described the high affinity of histidine for endotoxins [32]. In our work, despite the use of two different supports functionalized with histidine, the histidine-sepharose support was more effective at eliminating the endotoxins, while histidine-monolith was not so

effective. This difference can be justified by the different pH conditions, where at pH 8.0 the major interactions that are promoted are hydrophobic, while at pH 5.0, the imidazole ring become protonated and both electrostatic and hydrophobic interactions are explored. Therefore, it is reasonable to hypothesise that this combined effect can favour the endotoxins adsorption onto the histidine-monomer. In spite of the endotoxin levels present in sc pDNA purified by histidine-monomer were above the maximum limit established by FDA, a previous study indicate that the use of acidic pH can promote irreversible changes which may deactivate its biological activity [33]. In what concerns to gDNA, it was also verified the reduction of this impurity to residual levels in the three samples purified through the different chromatographic strategies, and the final pDNA samples were characterized with a gDNA content below the limit established by the regulatory agencies, thus evidencing the efficiency of the three chromatographic matrices in removing this impurity (Table 1). This assessment is extremely important because some studies demonstrated that the existence of gDNA in a purified plasmid sample for clinical application was directly related with necrosis of the muscle cells [34].

After endogenous biosynthesis of therapeutic plasmid in the *E. coli* host, the alkaline lysis used to extract this molecule can induce some structural damage in the plasmid, converting the sc pDNA in other isoforms such as, ln or oc pDNA. For this reason, the chromatographic supports explored in this work must be able to purify the most biologically active conformation, namely sc pDNA, and a homogeneity higher than 90% of this topology must be obtained. Therefore, the global sc pDNA isoform purity obtained using the distinct chromatographic matrices was assessed quantitatively by the CIMac analytical column and the results showed that the histidine-monomer allowed the recovery of the sc pDNA with a higher purity degree (100%), followed by histidine-agarose (97%) and arginine-macroporous (92%) (Table 1). The recovery yield was also higher in samples purified through the histidine-monomer (71.6%), followed by the other two supports (43%) (Table 1). Overall, although a higher recovery yield and purity degree were achieved with histidine-monomer, it was not possible to eliminate endotoxins to levels that meet the requirements of regulatory agencies. Moreover, the arginine-macroporous support allowed the use of milder conditions and the recovery yield and purity levels were also acceptable, which make this support an interesting alternative for pDNA purification.

3.2. Structural analysis of pDNA

3.2.1 Circular Dichroism

The structural stability of purified sc pDNA was assessed by circular dichroism (CD), foreseeing to evaluate if the distinct chromatographic strategies induce any changes in the topology of purified sc pDNA. Besides the information about the structural conformation of pDNA, this technique also shows the stability of the target molecule. Figure 2 shows the CD spectra of the sc pDNA samples recovered from the three different purification strategies, and for comparison purposes, a sample containing oc and sc pDNA obtained with a commercial Kit (oc+sc) was also analysed.

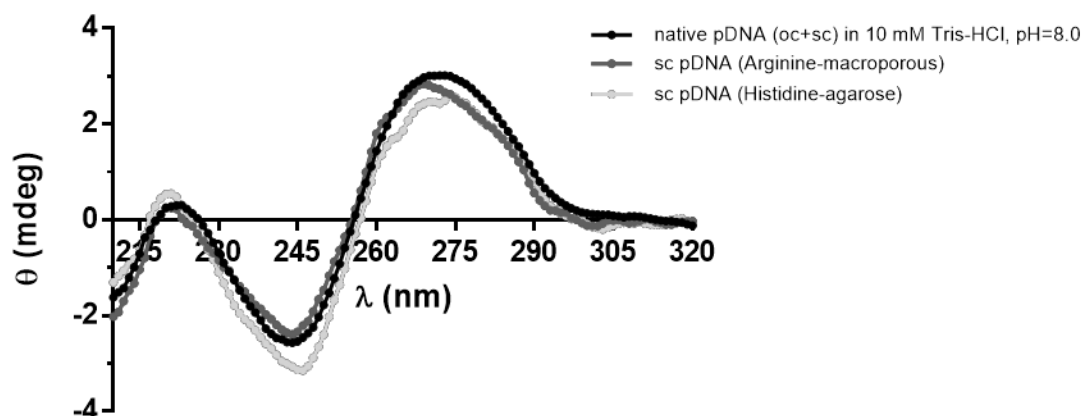
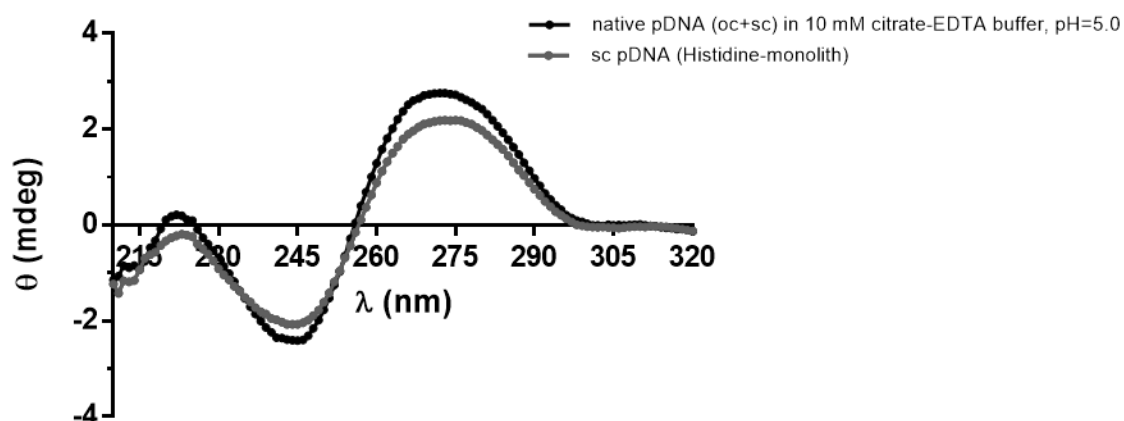
A)**B)**

Figure 2. Circular dichroism spectra of p53-pDNA samples. Native pDNA (oc+sc) recovered from a commercial Kit used as control, to confirm the stability of sc pDNA purified by: A) histidine-agarose and arginine-macroporous supports; B) histidine-monolith support. The pDNA control samples were prepared in the same buffer used for the purification of sc pDNA in each strategy (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 or 10 mM citrate-EDTA buffer, pH 5.0).

The CD spectra of the pDNA (oc+sc) samples obtained using the commercial kit are very similar for both buffers used (Fig.2A and B), being possible to identify two positive ellipticity peaks at 220 nm and 275 nm and a negative at 245 nm, which are indicative the typical topology of B-DNA [35,36]. This result demonstrates that these buffers did not induce significant changes on pDNA structure. When comparing these spectra with the ones obtained for the pDNA samples purified by our chromatographic methodologies, some minor alterations on the signals can be observed (Fig. 2). These slight changes in the bands' magnitude or deviations of the maximum can be associated to little changes in the pDNA molecules caused by the different chromatographic conditions used during the purification process, namely different temperature, ionic strength and pH. These differences are most evidenced in the samples purified by the supports modified with the histidine ligand, where we can note less intense bands. As reported in the literature, during the purification procedure, several parameters should be considered

and modulated, such as the mobile phase conditions, pH or temperature, in order to reach a better interaction between the ligands and the target. However, these parameters may also cause conformational changes in the molecule, which should be avoided [36,37]. In the present study, the different conditions and interaction profiles occurring between the target molecule and the supports can explain the small differences achieved on the CD spectra of samples purified with the histidine matrices. Both strategies were based on the use of a decreasing ammonium sulphate gradient, but they differ on the pH used. Thus, some structural changes can occur on pDNA due to the acidic conditions, as the low pH can lead to subtle depurination of pDNA, which can be detected by CD. On the other hand, it is feasible to relate some CD differences with the ionic strength used, as the salt concentration can modify the double-helix condensation, depending on the amount of available ions, especially cations [9], and in some extreme cases, it can undergo transition to A or Z-DNA conformation [38]. It is noteworthy that the signal of the sc pDNA purified by arginine-macroporous present a small deviation referring to the positive region for approximately 270 nm, while those purified by histidine point to 275 nm. This detail may also be a reflection of the binding conditions of the target molecule to the matrix promoted by the mobile phase buffer, since CD is known to reflect little conformational DNA changes [39], or just a reflection of the presence of a small amount of oc pDNA isoform (fig. 1B).

3.2.2 Zeta Potential

The zeta potential of sc pDNA solutions purified using the distinct chromatographic supports were evaluated using the Zetasizer Nano-ZS aiming to determine if the chromatographic conditions exert any change on the electric charge of sc pDNA. Thus, the zeta potential, which is established through the molecules surface charges and the concentration and types of ions present in the solution [40], was assessed. Through light scattering, the charge density was measured, and the result is shown in Figure 3.

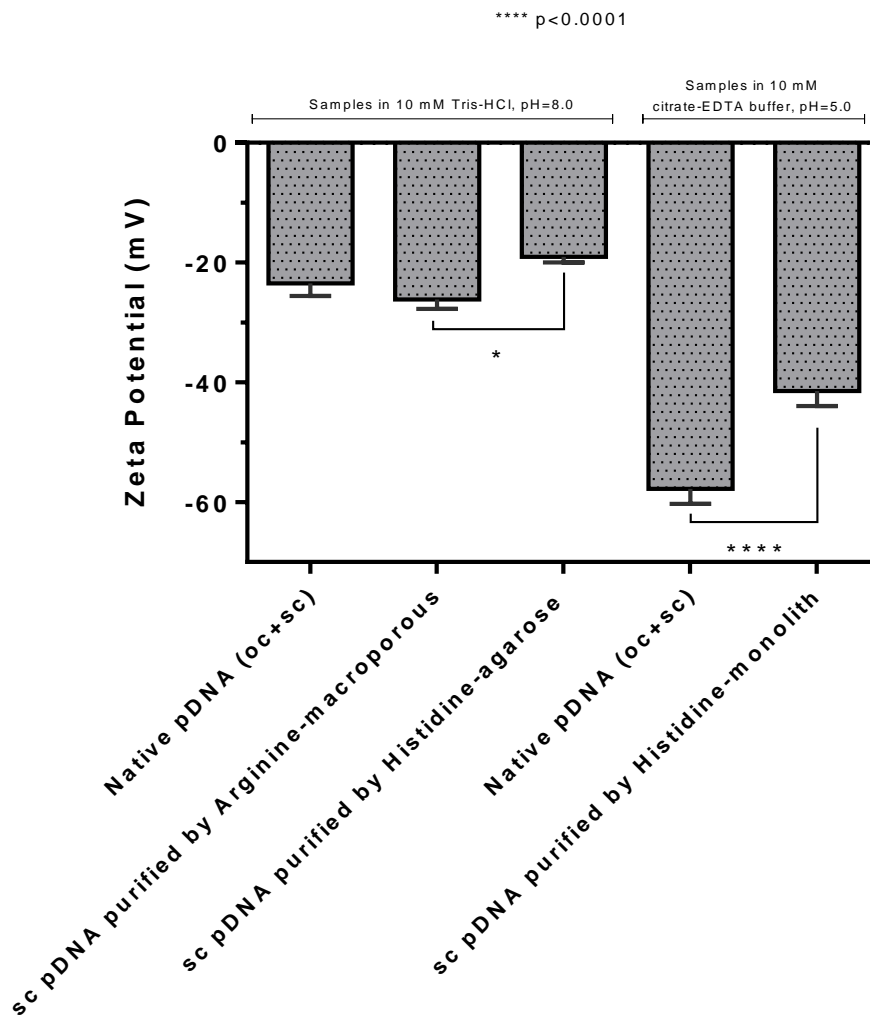


Figure 3. Zeta potential for pDNA purified by the three chromatographic strategies (histidine-agarose, arginine-macroporous and histidine-monolith), using different buffers. A native pDNA sample (oc+sc) purified by a commercial kit was used for comparison.

The pDNA molecules present negative charges on their surface and in solution they interact electrostatically with the available ions, resulting in repulsion or agglutination of these molecules. For the interaction and the equilibrium of the system, the tendency is the formation of a layer of counterions, in this case positive ions that adhere strongly to the negatively charged groups on the surface of the pDNA molecule, resulting in a compact layer or stern layer where the ions are immobilized [41]. This layer is then surrounded by ions with opposite charge that agglomerate together to neutralize the charged molecule, and these ions are in motion and hence the layer is called the diffuse layer [41]. The stability of the suspended molecule is dependent on both van der Waals forces and the double electric layer formed by ions and counterions, which in the case of therapeutic products, also can influence the cellular uptake and intracellular traffic [42]. The zeta potential, which is determined by the composition of ions involved in these layers, can be altered by both the ionic strength and pH of the solution [43]. In Figure 3, it is possible to observe that the samples obtained by the commercial Kit (oc + sc) clearly demonstrate a difference in the zeta potential values, mainly influenced by the pH difference of the buffers, 10 mM Tris-

HCl buffer, pH 8.0 (-22 mV) and 10 mM citrate-EDTA buffer, pH 5.0 (-55 mV). Regarding the pDNA samples purified by the chromatographic strategies where the Tris-HCl buffer was used, it is also verified a slight difference between them, even considering the same pH 8.0. This fact can be attributed to the salts used in the elution gradients established for the purification procedures, that even after the sample desalination, can be present in trace amounts or can be responsible for some structural changes on pDNA which influences the charged groups exposure, being sufficient to alter the ionic constitution of the electric double layer of the colloid. A more significant difference was achieved for the pDNA purified samples, present in buffers with different pH, namely Tris-HCl (pH 8.0) and citrate-EDTA buffer (pH 5.0), where the zeta potential values for pH 8 varied between -20 and -25 mV and, -40 mV to pH 5, respectively (Figure 3). Also, these results indicate that a decrease of pH can increase the negative zeta potential, improving the stability of pDNA on the formulation, in the case of this work, the protons in acidic pH, can alter the electrical double layer, leading to a reduction of the attraction forces and consequently the interaction between therapeutic molecules in the medium. As reported on literature, the agglomeration of biopharmaceuticals on the medium are associated with the low quality of product [43] and this agglomeration could occur mainly due to van der Waals forces, according the DLVO theory [44].

3.3 Bioactivity of pDNA

3.3.1 Cytotoxicity assays

The cytotoxicity studies were performed by using a Resazurin assay, in order to evaluate if there was any toxicity related with the sc pDNA samples recovered from different supports (Figure 4).

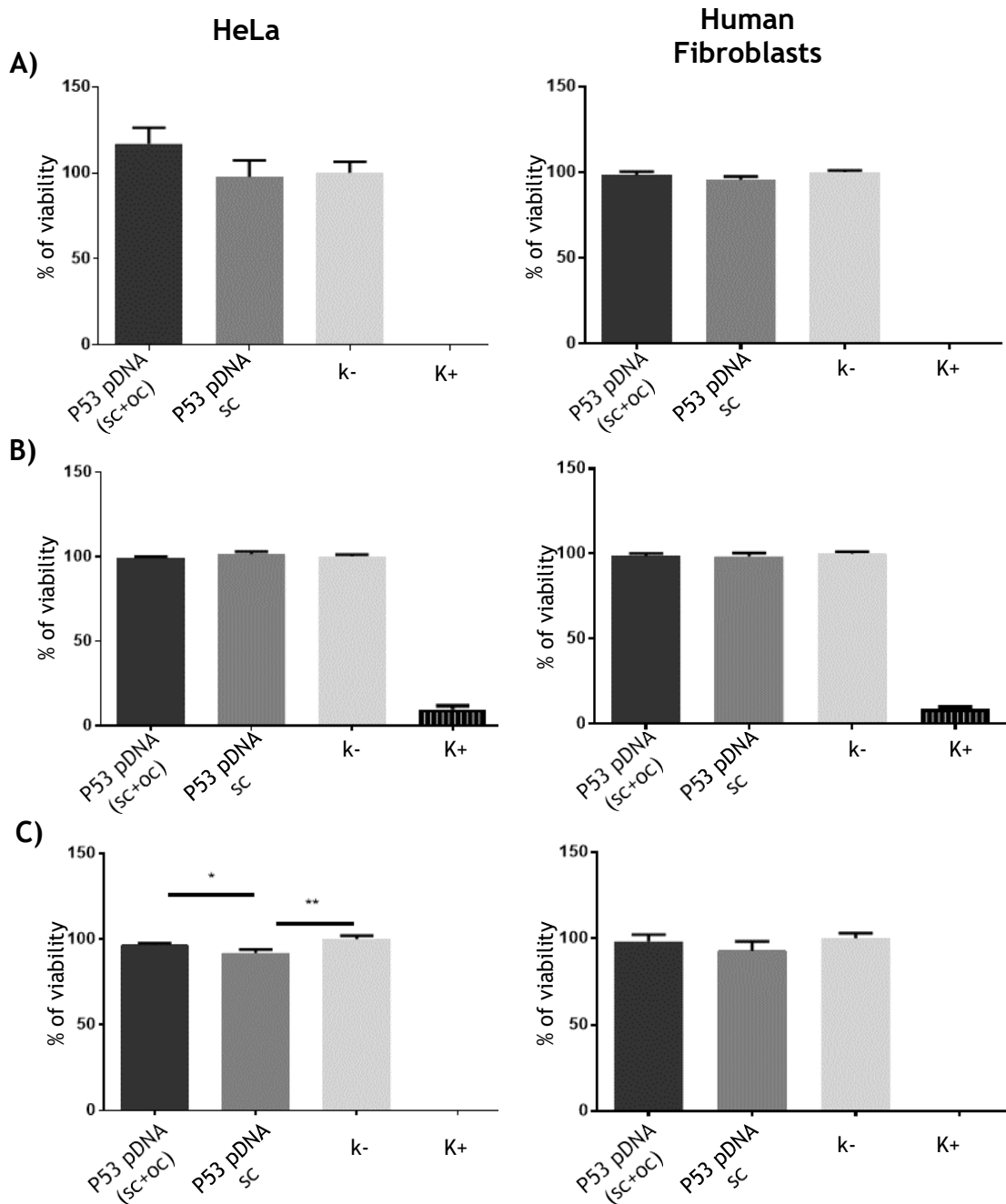


Figure 4. Evaluation of cell viability following transfection of HeLa and human dermal Fibroblasts with Lipofectamine 2000 lipoplexes loaded with p53-pDNA recovered from histidine-agarose A), arginine-macroporous B) and histidine-monolith C), after 48 h transfection. Negative (K-) and positive controls (K+) correspond, respectively to non-transfected cells and treated with ethanol. Data is represented as mean \pm S.D., n=3.

The results for human dermal Fibroblasts did not revealed significant cytotoxic effects after transfection with the purified sc p53 encoding pDNA samples. In the case of HeLa cell line, a slightly cytotoxic behaviour was observed in the cells transfected with the sc p53-pDNA samples recovered from the histidine-based columns, and among these samples, a more pronounced cytotoxic effect was verified when the sc pDNA was obtained from the histidine-monolithic support (Figure 4). These results could suggest

that the buffer conditions used for the recovery of sc pDNA (high ammonium sulphate concentration in the histidine-agarose and acidic pH in the histidine-monomolith) could cause some slight cytotoxicity. The samples purified with the arginine-macroporous support did not induce any cytotoxic effect what can be related with the milder conditions used during the purification process, namely the low NaCl concentration and pH 8.0. Overall, in this case, the cell viability can be affected by the pDNA sample (resulting from different preparation conditions), or some effect can also be related to the apoptosis induced by transfection. Actually, this phenomenon was previously observed and discussed by Valente et al. (2018). In that research work, it was verified that the reduction on cell viability was not directly related with the toxicity of the formulation, but it was more related with a higher p53 protein expression, resulting in a higher apoptotic effect for HeLa cancer cells [45]. Therefore, in our work, and considering the small cytotoxicity observed, further tests were performed to assess the pDNA bioactivity, namely regarding the ability to induce the p53 protein expression as well as the apoptotic effect induced on the HeLa cancer cells.

3.3.2 Analysis of the p53 protein expression

To better understand the bioactivity of the sc p53-pDNA isoform purified by the different chromatographic strategies, an ELISA assay was performed to evaluate the expression of p53 protein, after 48 h of HeLa cells transfection with the different samples (Figure 5).

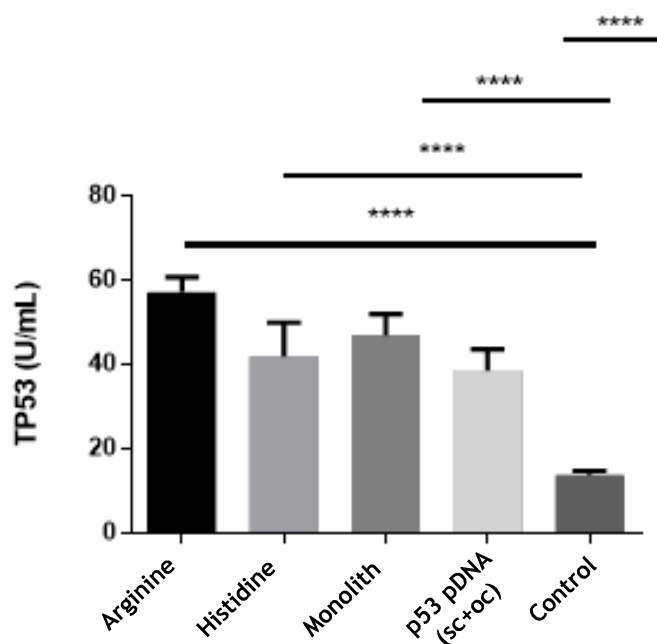


Figure 5. Evaluation of the p53 protein expression through ELISA kit in HeLa cancer cells after transfection with different p53-pDNA lipoplexes. Non-transfected cells were used as controls. Data are represented as mean ± S.D., n = 3.

For the control group, non-transfected HeLa cancer cells were used and, basal p53 expression levels were obtained. The low p53 levels presented by this kind of cells are described as a result of the degradation of this protein by the E6 and E7 oncoproteins from the HPV virus [45]. Also, a native p53-pDNA sample extracted through a commercial kit was used in this experiment to evaluate the bioactivity performance of a native sample (containing both isoforms, oc+sc) and compare with the efficiency found for the

different sc pDNA samples obtained from different chromatographic supports used in this research work. The p53 expression induced by the cells transfection with the plasmid extracted through the commercial kit also presents satisfactory results. However, this kind of sample is not suitable for *in vivo* use, since the procedure applied uses RNase from an animal source, which is not acceptable for the regulatory agencies and, in addition, it increases the costs of the process.

Figure 5 shows that the bioactivity of the sc p53 encoding plasmid remains independently of the chromatographic method chosen and, cells transfected with the isolated sc isoform presented higher p53 expression than cells transfected with a native sample (oc+sc). This kind of behaviour presented by HeLa cells when transfected with the sc pDNA isoform have been already explored and reported by other authors [45,46], what reinforces the importance of working with the sc topology, the most active form of pDNA. This ability of sc pDNA isoform to promote a higher protein expression has been related with the maintenance of the genetic information integrity [47], what can be different when a native pDNA sample is delivered.

Furthermore, sc pDNA samples obtained from different chromatographic strategies induced different p53 protein expression levels. A higher value was achieved for the sc pDNA purified with the arginine-macroporous, followed by the histidine-monolith, and finally the pDNA recovered from the histidine-agarose support. Actually, the sc p53-pDNA purified by the arginine-macroporous matrix induced an expression of the p53 protein 4 times higher than the control. Considering these results and relating them with the quality control tests (Table 1), it is verified that, although the sc p53-pDNA sample purified by arginine-macroporous matrix presents the lower purity level (92%), it induced a higher p53 protein expression. These results suggest that the kind of gradient or general conditions used during the plasmid purification process is of extreme importance for pDNA activity. The fact that milder conditions have been used, with a lower salt concentration and using a salt with lower environmental impact (NaCl), resulted in a non-significant effect on pDNA structure, which can be reflected on the pDNA bioactivity. Also, the low salt concentration used in the elution step (500 mM NaCl) required less manipulation of the sample during the desalting of the purified pDNA, possibly favouring the pDNA stability. Otherwise, samples purified through histidine monolith and histidine agarose, even with a higher purity level (100%) when compared with the samples recovered from arginine-macroporous support, showed lower efficiency at inducing the p53 expression. This result was even more pronounced for the sc p53-pDNA obtained by the histidine-agarose support, as the pDNA purified by the histidine-monolith resulted in a slightly higher p53 expression. This tendency can be related to the fact that the sc pDNA was eluted from the histidine monolith with 0 M of ammonium sulphate, which also required lower desalting manipulation. In addition, the use of monoliths allows the establishment of faster chromatographic runs, which can also help on the preservation of the structural stability of pDNA. In summary, it is clear that pH, ionic strength and type of salt, temperature as well as manipulation time influence not only the structure of pDNA, but also its bioactivity.

3.3.3 p53 mediated apoptosis in HeLa cells

The cellular apoptosis mediated by the p53 protein was evaluated in HeLa cancer cells. The Figure 6 shows the results of apoptosis concerning the pDNA products purified by the three different chromatographic matrices.

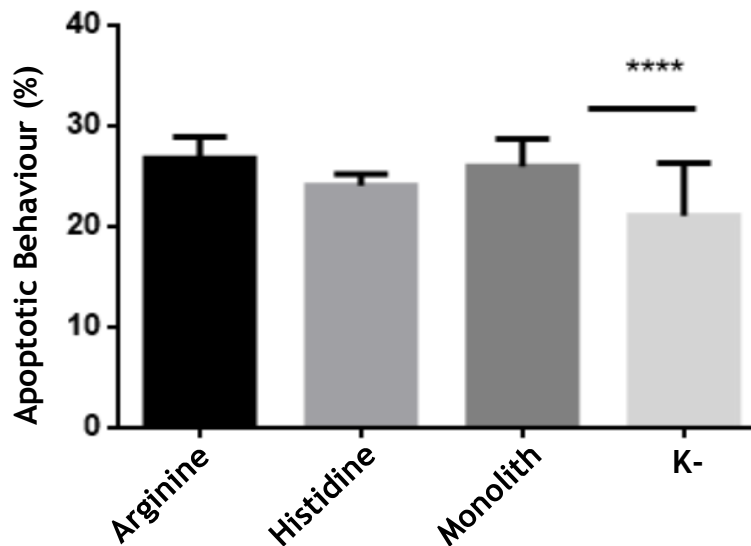


Figure 6. p53-mediated apoptosis in HeLa cells after transfection with a sc p53 plasmid recovered from different chromatographic supports.

The results reflect an apoptosis rate of approximately 6%, 3% and 5% for cells transfected with pDNA purified by arginine-macroporous support, histidine-agarose and histidine-monolith, respectively, when compared to the control group (k-). Comparing the results of p53 protein expression (Figure 5) with the apoptosis (Figure 6), it is possible to observe a pattern, because the conditions that allowed a higher p53 expression also resulted in higher rates of apoptosis mediated by the therapeutic gene, following the trend in the arginine-macroporous, histidine-monolith and histidine-agarose samples. If we take into consideration the protein expression levels that were achieved, we could expect higher apoptosis rates, following transgene levels, but actually we observe relatively low levels of apoptosis. Although the literature reports that p53 is the major tumor suppressor gene, there are also other proteins involved in the pathway of apoptosis and the inactivity or a reduced activity of any of these proteins could also compromise the apoptotic cycle. Although these relatively low apoptotic values, it was obtained a higher apoptotic rate in cells transfected with sc pDNA purified from arginine-macroporous support, which also presented high expression levels of the therapeutic gene (Figure 5). However, if we consider the complexity of cancer, we understand that not only one, but several genes in the genome can be affected by different types of mutation and in the same way, promoter sequences of these genes, may be inactivated or even reduce the expression of a particular protein. There are known cases, such as colon, breast, brain, or pancreas cancers, which average 33 to 66 different types of genetic mutation and in other cases up to 200 types of genetic material damage are detected [48]. Based on this information, we may consider that other genes involved in the cascade that triggers apoptosis may also be inactivated. In addition, it is recognized that a cancer cell is in constant mutation, aiming at greater propagative advantage, guaranteeing not only suppression of any mechanism of programmed cell death but also the specialization of growth genes [49]. In a study that reveals the intricate genetic structure after successive mutational events occurring in HeLa cells almost 70 years after the extraction of the cells from the patient Henrieta Lacks, researchers have shown that genetic aberrations during these years, may have unknown implications in biological experiments, since these cells have a genomic instability typical of tumors [50] [51].

4. Conclusion

Three methods involving histidine-agarose, arginine-macroporous and histidine-monolith supports were applied to isolate sc pDNA encoding p53, by manipulating the chromatographic conditions: pH, temperature, ionic strength and kind of salt in the binding/elution buffers. These main parameters of the mobile phases influenced not only the physical structure of the plasmid but also the bioactivity of this therapeutic molecule. With the topology studies it was verified that, despite small non-significant differences detected by dichroism signals, the CD spectra clearly show that the B topology of pDNA was maintained in the samples purified through the three chromatographic supports. In zeta potential assay, the results suggested that the colloidal stability of purified samples inside formulations are preserved and the more stable formulation follow the order of the purification with: histidine-monolith > arginine-macroporous > histidine-agarose. Overall, the bioactivity assays allow to indicate that the arginine-macroporous is the most efficient matrix used in this work, because despite the 92% of purity degree and the 43% of recovery yield, the sample obtained by this column was able to induce the expression of higher amounts of the therapeutic p53 protein and induced higher levels of apoptosis on cancer cells. This behavior can be related to the chromatographic conditions, namely the use of a milder salt (NaCl), the low ionic strength, at neutral pH and low temperatures used in arginine-macroporous when compared to the high ionic strength of ammonium sulphate and room temperature or acidic pH used in histidine-based columns. The data obtained in this work show the features of each purification condition and this information allows the elaboration of good chromatographic strategies based in arginine which in addition to purifying pDNA with a high pharmaceutical grade, was also efficient in preserving the bioactivity of the plasmid.

5. Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Thomas Roberts for providing the pcDNA3 -FLAG -p53 construct through Addgene, ref: 10838. This work was supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalization in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project POCI-01-0145-FEDER-007491), National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709/2013). This work was also developed within the scope of the project CICECO-Aveiro Institute of Materials, FCT Ref. UID/CTM/50011/2019, financed by national funds through the FCT/MCTES. G.M. Azevedo acknowledges the support and fellowship to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/203482/2014-0). J.F.A. Valente acknowledges the PhD fellowship (Ref SFRH/BD/96809/2013) from FCT.

6. References

- [1] K. Tomczak, P. Czerwińska, and M. Wiznerowicz, "Review The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge," *Współczesna Onkol.*, vol. 1A, no. 1A, pp. 68-77, 2015.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer.," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57-70, Jan. 2000.
- [3] Y. A. Fouad and C. Aanei, "Revisiting the hallmarks of cancer.," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 7, no. 5, pp. 1016-1036, Jan. 2017.
- [4] F. Chen, W. Wang, and W. S. El-Deiry, "Current strategies to target p53 in cancer.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 80, no. 5, pp. 724-30, Sep. 2010.
- [5] M. P. Kim, Y. Zhang, and G. Lozano, "Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer.," *Front. Oncol.*, vol. 5, no. August, p. 249, Nov. 2015.
- [6] J.-P. Kruse and W. Gu, "Modes of p53 regulation.," *Cell*, vol. 137, no. 4, pp. 609-22, May 2009.
- [7] A. Sousa, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification.," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3046-58, Nov. 2012.
- [8] C. L. Hardee, L. M. Arévalo-Soliz, B. D. Hornstein, and L. Zechiedrich, "Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy.," *Genes (Basel)*, vol. 8, no. 2, p. 65, Feb. 2017.
- [9] D. M. F. Prazeres, *Plasmid Biopharmaceuticals*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [10] W. Doerfler, U. Hohlweg, K. Müller, R. Remus, H. Heller, and J. Hertz, "Foreign DNA integration--perturbations of the genome--oncogenesis.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 945, no. 1, pp. 276-88, Sep. 2001.
- [11] D. Petsch and F. B. Anspach, "Endotoxin removal from protein solutions.," *J. Biotechnol.*, vol. 76, no. 2-3, pp. 97-119, Jan. 2000.
- [12] J. Briggs and P. R. Panfili, "Quantitation of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals.," *Anal. Chem.*, vol. 63, no. 9, pp. 850-9, May 1991.
- [13] F. Sousa, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA.," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 9, pp. 518-25, Sep. 2008.
- [14] R. K. Evans, Z. Xu, K. E. Bohannon, B. Wang, M. W. Bruner, and D. B. Volkin, "Evaluation of degradation pathways for plasmid DNA in pharmaceutical formulations via accelerated stability studies.," *J. Pharm. Sci.*, vol. 89, no. 1, pp. 76-87, Jan. 2000.
- [15] S. Kundu, S. Mukherjee, and D. Bhattacharyya, "Effect of temperature on DNA double helix: An insight from molecular dynamics simulation," *J. Biosci.*, vol. 37, no. 3, pp. 445-455, Jul. 2012.
- [16] O. Gjoerup, D. Zaveri, and T. M. Roberts, "Induction of p53-Independent Apoptosis by Simian Virus 40 Small t Antigen," *J. Virol.*, vol. 75, no. 19, pp. 9142-9155, Oct. 2001.
- [17] L. DONG, L.-B. LÜ, and R. LAI, "Molecular cloning of Tupaia belangeri chinensis neuropeptide Y and homology comparison with other analogues from primates," *Zool. Res.*, vol. 33, no. 1, pp. 75-78, Feb. 2013.
- [18] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, G. A. Monteiro, S. A. Martins, G. N. Ferreira, and D. M. Prazeres, "Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 68, no. 5, pp. 576-83, Jun. 2000.
- [19] O. Pitiot and M. A. Vijayalakshmi, "Immobilized histidine ligand affinity chromatography," in *Biochromatography*, CRC Press, 2002.

- [20] É. Mota, Â. Sousa, U. Černigoj, J. A. Queiroz, C. T. Tomaz, and F. Sousa, "Rapid quantification of supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid using a monolithic ion exchanger," *J. Chromatogr. A*, vol. 1291, pp. 114-121, May 2013.
- [21] M. Konishi, K. Kawamoto, M. Izumikawa, H. Kuriyama, and T. Yamashita, "Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors," *J. Gene Med.*, vol. 10, no. 6, pp. 610-618, Jun. 2008.
- [22] A. Soares, J. A. Queiroz, F. Sousa, and A. Sousa, "Purification of human papillomavirus 16 E6/E7 plasmid deoxyribonucleic acid-based vaccine using an arginine modified monolithic support.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1320, pp. 72-9, Dec. 2013.
- [23] F. Sousa, T. Matos, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography.," *Anal. Biochem.*, vol. 374, no. 2, pp. 432-4, Mar. 2008.
- [24] F. Sousa, S. Freitas, A. R. Azzoni, D. M. F. Prazeres, and J. Queiroz, "Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step.," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 45, no. Pt 3, pp. 131-40, Nov. 2006.
- [25] L. F. A. Amorim *et al.*, "Chromatographic HPV-16 E6/E7 plasmid vaccine purification employing L-histidine and 1-benzyl-L-histidine affinity ligands," *Electrophoresis*, vol. 38, no. 22-23, pp. 2975-2980, Nov. 2017.
- [26] B. F. Roettger, J. A. Myers, M. R. Ladisch, and F. E. Regnier, "Adsorption Phenomena in Hydrophobic Interaction Chromatography," *Biotechnol. Prog.*, vol. 5, no. 3, pp. 79-88, Sep. 1989.
- [27] F. Sousa, C. T. Tomaz, D. M. F. Prazeres, and J. A. Queiroz, "Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support," *Anal. Biochem.*, vol. 343, no. 1, pp. 183-185, Aug. 2005.
- [28] N. M. Luscombe, R. A. Laskowski, and J. M. Thornton, "Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 13, pp. 2860-74, Jul. 2001.
- [29] M. M. Hoffman, "AANT: the Amino Acid-Nucleotide Interaction Database," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 90001, pp. 174D - 181, Jan. 2004.
- [30] A. Ghanem, R. Healey, and F. G. Adly, "Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: a review.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 760, pp. 1-15, Jan. 2013.
- [31] C. Hirayama and M. Sakata, "Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles," *J. Chromatogr. B*, vol. 781, no. 1-2, pp. 419-432, Dec. 2002.
- [32] H. Matsumae, S. Minobe, K. Kindan, T. Watanabe, T. Sato, and T. Tosa, "Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilized histidine," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1990.
- [33] S. Rajani, R. Archana, Y. R. Indla, and P. Rajesh, "Beneficial Effects of Yogasanas and Pranayama in limiting the Cognitive decline in Type 2 Diabetes.," *Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol.*, vol. 7, no. 3, pp. 232-235, Aug. 2017.
- [34] C. I. Wooddell *et al.*, "Muscle damage after delivery of naked plasmid DNA into skeletal muscles is batch dependent.," *Hum. Gene Ther.*, vol. 22, no. 2, pp. 225-35, Feb. 2011.
- [35] T. Thomas *et al.*, "Effects of natural and synthetic polyamines on the conformation of an oligodeoxyribonucleotide with the estrogen response element.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, no. 12, pp. 2396-402, Jun. 1997.

- [36] Â. Sousa, P. Pereira, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Binding mechanisms for histamine and agmatine ligands in plasmid deoxyribonucleic acid purifications," *J. Chromatogr. A*, vol. 1366, pp. 110-119, Oct. 2014.
- [37] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, G. A. Monteiro, and D. M. Prazeres, "Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography.," *Anal. Biochem.*, vol. 275, no. 1, pp. 122-4, Nov. 1999.
- [38] J. M. Davis, "Critique of single amine theories: evidence of a cholinergic influence in the major mental illnesses.," *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, vol. 54, no. 8, pp. 333-46, Feb. 1975.
- [39] I. Kejnovská, J. Kypr, and M. Vorlíčková, "Circular dichroism spectroscopy of conformers of (guanine + adenine) repeat strands of DNA," *Chirality*, vol. 15, no. 7, pp. 584-592, Aug. 2003.
- [40] R. D. Nolker and L. Zhou, "Social Computing and Weighting to Identify Member Roles in Online Communities," in *The 2005 IEEE/WIC/ACM International Conference on Web Intelligence (WI'05)*, 2014, pp. 87-93.
- [41] H. P. Fernandes, C. L. Cesar, and M. de L. Barjas-Castro, "Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation.," *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, vol. 33, no. 4, pp. 297-301, 2011.
- [42] M. Gumustas, C. T. Sengel-Turk, A. Gumustas, S. A. Ozkan, and B. Uslu, "Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems," in *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, Elsevier, 2017, pp. 67-108.
- [43] G. W. Lu and P. Gao, "Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery," in *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, Elsevier, 2010, pp. 59-94.
- [44] S. Honary and F. Zahir, "Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1)," *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 255-264, May 2013.
- [45] J. F. A. Valente, A. Sousa, V. M. Gaspar, J. A. Queiroz, and F. Sousa, "The biological performance of purified supercoiled p53 plasmid DNA in different cancer cell lines," *Process Biochem.*, vol. 75, pp. 240-249, Dec. 2018.
- [46] V. M. Gaspar *et al.*, "Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy.," *J. Control. Release*, vol. 156, no. 2, pp. 212-22, Dec. 2011.
- [47] M. Schleef and T. Schmidt, "Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications," *J. Gene Med.*, vol. 6, no. S1, pp. S45-S53, Feb. 2004.
- [48] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. a Diaz, and K. W. Kinzler, "Cancer genome landscapes.," *Science*, vol. 339, no. 6127, pp. 1546-58, Mar. 2013.
- [49] J. S. Bertram, "The molecular biology of cancer.," *Mol. Aspects Med.*, vol. 21, no. 6, pp. 167-223, Dec. 2000.
- [50] B. P. Lucey, W. A. Nelson-Rees, and G. M. Hutchins, "Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination.," *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 133, no. 9, pp. 1463-7, Sep. 2009.
- [51] J. J. M. Landry *et al.*, "The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line.," *G3 (Bethesda)*, vol. 3, no. 8, pp. 1213-24, Aug. 2013.