



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

# **Avaliação da Ação de um Vetor Multigénico de DNA Minicircular em Células Cancerígenas do Colo do Útero**

**Diana Carvalho Pereira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Ciências Biomédicas**

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Ângela Maria Almeida de Sousa

Coorientadora: Professora Doutora Fani Pereira de Sousa

**Covilhã, novembro de 2019**



*Para os meus pais, o meu irmão e o meu namorado,  
que são tudo na minha vida.*



# Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Ângela Sousa por todo o conhecimento científico que partilhou comigo, por ter proporcionado a realização de todo este projeto e por todo o apoio disponibilizado ao longo deste ano. Também gostaria de agradecer à minha coorientadora Professora Doutora Fani Sousa porque sempre se demonstrou disponível e por ter ajudado a colocar várias situações em perspetiva o que foi muito útil neste meu percurso.

À Margarida e à Dalinda por se terem demonstrado sempre disponíveis para ajudar e por terem partilhado comigo todo o vosso conhecimento e sapiência apesar das vossas vidas também super atarefadas conseguiram sempre encontrar um tempinho para ajudar nem que fosse só com uma palavra de conforto e incentivo no momento certo mas que significou imenso para mim.

À minha amiga Adriana por teres feito todo este caminho lado a lado comigo e por toda a ajuda incondicional que sempre me deste. Sem ti tudo seria muito mais difícil e sem piada. Obrigada por todos os momentos partilhados desde as noitadas no laboratório aos feriados e fins de semana que passamos as duas a trabalhar, sei que crescemos imenso durante este longo ano e um obrigada não é suficiente!

Às minhas amigas Rita Carapito, Raquel, Micaela por todas as conversas e momentos marcantes que partilhamos juntas que sem dúvida tiveram um peso enorme em muitas das minhas decisões, obrigada meninas. Ao resto dos meus amigos Daniel, Rosa, Flor, Rita Proença, Diana, Bruno, Duarte, Sofia, Fafe e Bifas obrigada pessoal por todos os bons momentos de risadas e descontração que vivemos juntos que me ajudaram imenso a elevar a moral mesmo quando me encontrava mais em baixo e quero que saibam que vos levo no meu coração sempre.

Ao meu irmão Rafael, Mano obrigada por todo o orgulho que sei que sempre sentiste em mim e que também sinto por ti e obrigada por toda a ajuda que sempre me deste sem pedires nada em troca. Espero que a nossa amizade e cumplicidade nunca mude e quero-te sempre ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida tal como tem sido até aqui.

Ao meu namorado Fábio obrigada por todo o amor e compreensão que sempre demonstraste e por todo o carinho e paciência que sempre tiveste comigo.

E por fim, aos meus pais Maria Rosa e Lino obrigada por toda a ajuda que sempre me deram ao longo de toda a minha vida, pelo amor incondicional e por todo o esforço que fizeram para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos e ser feliz pois sempre colocaram a minha felicidade à frente da vossa. Amo-vos e nunca poderei agradecer tudo o que fizeram por mim.



## Resumo

O cancro é um grande problema de saúde global, contando com mais de 8 milhões de mortes por ano a nível mundial, sendo o cancro cervical a terceira malignidade mais comum com a infecção persistente por HPV de alto risco (HR-HPV) o fator principal para o seu desenvolvimento. O papilomavírus humano (HPV) é um vírus de DNA de cadeia dupla sendo os tipos de HR-HPV 16/18 os mais comuns que codificam para as oncoproteínas E6 e E7 e são responsáveis pela degradação e inativação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRB, respetivamente. A terapia génica tem demonstrado grande potencial para o tratamento de várias doenças genéticas, induzindo a expressão do gene transferido a longo termo e com níveis elevados o suficiente para ter o efeito terapêutico desejado. Isto pode ser alcançado ao usar vetores inovadores de DNA minicircular (mcDNA): pequenos vetores de expressão não-virais; para substituir os níveis de p53 e pRB. Os microRNAs (miRs) têm sido identificados como reguladores importantes da tumorigénese. Por exemplo tem sido descrito que o miR-375 tem a capacidade de silenciar as oncoproteínas E6 e E7 do HPV. Assim, o presente trabalho tem como objetivo a produção e purificação de quatro vetores de mcDNA: o mcDNA-vazio, o mcDNA-p53, o mcDNA-primiR-375 e o mcDNA-conjugado (com p53 e primiR-375), usando metodologias já descritas, para avaliar o efeito isolado de cada gene e o efeito do vetor multigénico, em comparação com o vetor vazio, por estudos de transfeção de células cancerígenas do colo do útero. Após os processos de fermentação e conversão do mcDNA a partir do seu precursor de plasmídeo parental (PP) induzida por L-arabinose, mostrou-se que a forma mais rentável de purificar os vetores de mcDNA seria por cromatografia de exclusão molecular, utilizando uma coluna de 60 cm para separar o mcDNA-vazio e o mcDNA-primiR375, uma de 90 cm para o mcDNA-p53 e o mcDNA-conjugado e para todos um caudal de 0,3 mL/min. Para perceber qual o melhor tipo de células a ser utilizado foi feita uma comparação dos níveis dos transcritos de E6 m células Hela, SiHa e Caski por RT-PCR e verificou-se que nas células CaSki os níveis de E6 eram mais elevados. Assim, após a transfeção, estudos de viabilidade celular e proliferação em fibroblastos humanos (FibH) e células cancerígenas CaSki indicaram que os vetores terapêuticos não apresentaram toxicidade para os FibH, mas reduziram a viabilidade nas células CaSki com efeito mais pronunciado nos vetores mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado. Além disso verificou-se por RT-qPCR que os níveis dos transcritos de p53 aumentaram e os de E6 e E7 diminuíram após 24 h nas células transfetadas com os vetores terapêuticos.

## Palavras-Chave

Células cancerígenas cervicais, DNA minicircular, miR-375, p53, Terapia Génica.



## Abstract

Cancer is a major global health problem, with over 8 million deaths/year worldwide, with cervical cancer being the third most common malignancy having persistent high-risk HPV (HR-HPV) infection as a major factor. for its development. Human papillomavirus (HPV) is a double stranded DNA virus with the types HR-HPV16/18 being the most common and encoding for the E6 and E7 oncoproteins that are responsible for the degradation and inactivation of p53 tumor suppressor proteins and pRB, respectively. Gene therapy has shown great potential for treating various genetic diseases by inducing long term expression of the transferred gene at levels high enough to have a desired therapeutic effect. This can be achieved by using innovative minicircular DNA (mcDNA) vectors: small non-viral expression vectors; to replace p53 and pRB levels. MicroRNAs (miRs) have been identified as important regulators of tumorigenesis, for example it has been reported that miR-375 has the capacity to silence HPV E6 and E7 oncoproteins. Thus, the present work aims at the production and purification of four mcDNA vectors: mcDNA-empty, mcDNA-p53, mcDNA-primiR-375 and mcDNA-conjugate (with p53 and primiR-375), using methodologies already described, to evaluate the isolated effect of each gene and the effect of the multigenic vector compared to the empty vector by transfection of cervical cancer cells. Following the fermentation and conversion processes of mcDNA from its L-arabinose-induced parent plasmid (PP) precursor, it was shown that the best way to purify mcDNA vectors would be by size exclusion chromatography, using a 60cm column to separate the mcDNA-empty and mcDNA-primiR-375, a 90cm column for mcDNA-p53 and mcDNA-conjugate and for both a flow rate of 0.3 mL/min. In order to understand which cell type was best to be used, a comparison of E6/E7 levels in Hela, SiHa and Caski cells was made by RT-PCR and it was found that in CaSki cells E6/E7 levels were more intense than in the other two types. Thus, after transfection, cell viability studies and proliferation in non-carcinogenic human fibroblasts (FibH) and CaSki cancer cells indicated that therapeutic vectors did not show toxicity to FibH but reduced viability in CaSki cells with more pronounced effect on mcDNA-p53 and mcDNA-conjugate vectors. Furthermore, RT-qPCR showed that p53 transcript levels increased and E6 / E7 decreased after 24H in cells transfected with therapeutic vectors.

## Keywords

Cervical cancer cells, Gene therapy, Minicircle DNA, miR-375, p53.



# Lista de Conteúdos

Capítulo 1 - Introdução .....	1
1.1. A Célula.....	3
1.2. Cancro .....	4
1.2.1. Cancro do Colo do Útero .....	5
1.2.1.1. Incidência do Cancro Cervical na Europa e em Portugal .....	6
1.3. Vírus do Papiloma Humano (HPV) .....	8
1.3.1. Classificação do HPV.....	8
1.3.1.1. Genoma do HPV .....	10
1.3.2. Ciclo de vida do HPV.....	12
1.3.3. Oncogenes Virais .....	13
1.3.3.1. Genes E1 e E2 .....	13
1.3.3.2. Genes E6 e E7 .....	13
1.4. Terapia Génica .....	16
1.4.1. Proteína RB (pRB) .....	20
1.4.2. Proteína 53 (p53).....	21
1.4.3. Micro RNAs (miRNAs) .....	22
1.4.3.1. Micro RNA 375 (miR375).....	24
1.4.3.2. Interação entre o miR375 e as oncoproteínas E6 e E7 .....	25
1.5. DNA minicircular (mcDNA) .....	26
1.5.1. DNA plasmídico (pDNA).....	26
1.5.2. Classificação do mcDNA .....	27
1.5.3. Produção de mcDNA .....	28

Avaliação da Ação de um Vetor Multigénico de DNA Minicircular em Células Cancerígenas do Colo do Útero	
1.5.3.1. Integrase do Fago Lambda ( $\lambda$ -Int) .....	28
1.5.3.2. Recombinação causada (Cre) pela recombinase do Fago P1 .....	29
1.5.3.3. ParA resolvase.....	29
1.5.3.4. Sistema recombinase $\phi$ C31/endonuclease I-SceI .....	29
1.5.4. Purificação - Princípios da Cromatografia.....	30
1.5.4.1. Cromatografia de Afinidade.....	31
1.5.4.2. Cromatografia de Troca Iónica .....	31
1.5.4.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica .....	32
1.5.4.4. Cromatografia de Fase Reversa.....	32
1.5.4.5. Cromatografia de Filtração em Gel ou Cromatografia de Exclusão Molecular .	32
1.5.5. Purificação de mcDNA.....	34
Capítulo 2 - Objetivos Globais.....	37
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	41
3.1. Produção .....	43
3.1.1. Fermentação .....	43
3.1.2. Indução.....	43
3.2. Extração.....	44
3.2.1. Extração de mcDNA recorrendo ao Kit Qiagen .....	44
3.2.1.1. Extração de mcDNA recorrendo ao Kit Qiagen de acordo com as instruções do fabricante .....	44
3.2.1.2. Extração de mcDNA recorrendo ao Kit Qiagen adaptado .....	44
3.2.2. Extração Modificada de Amostra Complexa.....	45
3.3. Purificação.....	45
3.3.1. Cromatografia de Filtração em Gel ou Exclusão Molecular .....	45

Avaliação da Ação de um Vetor Multigênico de DNA Minicircular em Células Cancerígenas do Colo do Útero	
3.3.1.1. Coluna de 60 cm .....	45
3.3.1.2. Coluna de 90 cm .....	46
3.3.2. Eletroforese.....	46
3.4. Estudos <i>in vitro</i> .....	46
3.4.1. Transfeção .....	46
3.4.2. Ensaio de Viabilidade Celular .....	47
3.4.3. Ensaio de Proliferação Celular .....	47
3.4.4. Extração de RNA.....	48
3.4.5. Síntese de cDNA .....	49
3.4.6. RT-PCR.....	49
3.4.7. RT-qPCR .....	49
3.4.7.1. Eficiência de primers .....	50
Capítulo 4 - Resultados e Discussão.....	53
4.1. Produção .....	55
4.2. Extração .....	55
4.2.1. Extração por Kit Qiagen.....	55
4.2.1.1. Kit de acordo com as instruções do fabricante .....	55
4.2.1.2. Kit adaptado .....	56
4.2.2. Extração Modificada de Amostra Complexa .....	57
4.3. Purificação .....	58
4.3.1. Cromatografia de Filtração em Gel.....	58
4.3.1.1. Coluna de 60 cm .....	58
4.3.1.2. Coluna de 90 cm .....	62
4.4. Estudos <i>in vitro</i> .....	64

Avaliação da Ação de um Vetor Multigénico de DNA Minicircular em Células Cancerígenas do Colo do Útero	
4.4.1. Ensaio de Viabilidade Celular .....	64
4.4.2. Ensaio de Proliferação Celular .....	66
4.4.3. RT-PCR e RT-qPCR .....	67
Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras .....	73
Referências .....	77
ANEXO I .....	83

# Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do ciclo celular. ....	4
Figura 2: Incidência do cancro do colo do útero a nível global. ....	5
Figura 3: Taxas de incidência de cancro do colo do útero estimadas para 2018, em mulheres com idades compreendidas entre os 10 e os 34 anos.....	6
Figura 4: Distribuição dos casos infeção por HPV, setembro de 2014-dezembro de 2016. ....	7
Figura 5: Progressão da doença cervical e listas de fatores contribuintes. ....	10
Figura 6: Organização do genoma do HPV16.....	11
Figura 7: Infeção pelo HPV e a zona de transformação. ....	13
Figura 8: Representação esquemática dos mecanismos de ação das oncoproteínas E6 e E7 do HPV. ....	15
Figura 9: Modelo da cooperação entre as oncoproteínas E6 e E7 do HPV durante a transformação de células malignas. ....	15
Figura 10: Indicações em ensaios clínicos de terapia génica. O gráfico de barras classifica os estudos clínicos de transferência génica por doença.....	17
Figura 11: Tipos de terapia génica. ....	20
Figura 12: Domínios da p53. ....	21
Figura 13: Papel central da p53 na resposta celular ao stress. A p53 determina o destino da célula após múltiplos sinais de stress exógenos e endógenos. ....	22
Figura 14: Representação da via canónica de biogénese de miRNAs.....	24
Figura 15: Efeitos do miR375 nos seus alvos e conseqüentes alterações celulares que daí provêm. ....	25
Figura 16: Esquema representativo da produção do vetor de DNA minicircular (mcDNA) a partir do plasmídeo parental (PP).....	27
Figura 17: Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia. ....	31

Figura 18: Representação esquemática do processo de cromatografia de exclusão molecular: (1) a amostra é aplicada à coluna; (2) a molécula de menos tamanho (amarela) é mais atrasada que a molécula de maior tamanho (azul escuro); (3) a molécula de maior tamanho é eluída primeiro da coluna.....	34
Figura 19: Representação esquemática do processo de produção de mcDNA. ....	43
Figura 20: Representação esquemática do procedimento de transfeção <i>in vitro</i> .....	47
Figura 21: Representação esquemática do protocolo de extração de RNA. ....	48
Figura 22: Representação gráfica da eficiência de <i>primers</i> para o transcrito do gene <i>housekeeping</i> Gapdh com uma eficiência de 99,70%. ....	50
Figura 23: Representação gráfica da eficiência de <i>primers</i> para o transcrito do gene p53 com uma eficiência de 104,03%.....	51
Figura 24: Representação gráfica da eficiência de <i>primers</i> para o transcrito do gene E6 com uma eficiência de 96,42%. ....	51
Figura 25: Representação gráfica da eficiência de <i>primers</i> para o transcrito do gene E7 com uma eficiência de 98,32%. ....	51
Figura 26: Representação gráfica da curva de crescimento para cada um dos vetores.....	55
Figura 27: Eletroforese proveniente da extração com o kit de acordo com as instruções do fabricante. A - mcDNA-conjugado; B - mcDNA-primiR-375; 1 - Lisado; 2 - Sobrenadante; 3 - Solução lavagem I; 4 - Solução lavagem II; 5 - Solução eluição; 6 - Amostra final. ....	56
Figura 28: Eletroforese proveniente da extração com o kit adaptado. A - Vetor Conjugado = 72,5 µg de mcDNA; B - Vetor primiR-375 = 58 µg de mcDNA; 1 - Lisado; 2 - Sobrenadante; 3 - Solução lavagem I; 4 - Solução lavagem II; 5 - Solução eluição; 6 - Amostra final. ....	57
Figura 29: Eletroforese de amostras de mcDNA-primiR-375, mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado obtidas com a extração modificada. 1 - [mcDNA-primiR-375] = 234 µg/mL; 2 - [mcDNA-p53] = 230 µg/mL; 3 - [mcDNA-primiR-375+p53] = 203 µg/mL.....	58
Figura 30: Cromatograma do vetor mcDNA-primiR-375 na coluna de 60cm. ....	59
Figura 31: Eletroforese em gel de agarose correspondente ao pico do vetor de mcDNA-primiR-375. ....	60
Figura 32: Cromatograma do vetor mcDNA-p53 na coluna de 60 cm. ....	61
Figura 33: Eletroforese em gel de agarose correspondente ao pico do vetor de mcDNA-p53..	61

Figura 34: Cromatograma do vetor mcDNA-conjugado na coluna de 60cm. ....	62
Figura 35: Eletroforese em gel de agarose de todas as frações recolhidas da cromatografia de exclusão molecular do vetor mcDNA-conjugado na coluna de 60cm. As frações correspondentes ao pico de mcDNA estão destacadas dentro do retângulo. ....	62
Figura 36: Cromatograma do vetor mcDNA-conjugado na coluna de 90cm. ....	63
Figura 37: Eletroforese em gel de agarose de todas as frações recolhidas da cromatografia de exclusão molecular do vetor mcDNA-conjugado na coluna de 90cm. As frações correspondentes ao pico de mcDNA estão destacadas dentro do retângulo. ....	63
Figura 38: Percentagens de viabilidade celular em FibH (A) e em células CaSki (B), após transfecções com os vetores durante 24, 36, 48 e 72 horas. Os ensaios foram realizados com um n = 3 e a análise estatística foi realizada com o teste two-way ANOVA. Encontram-se representadas as significâncias estatísticas (** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001; SS - sem significância). ....	65
Figura 39: Ensaio de proliferação com células CaSki transfetadas com os vetores durante 24, 36, 48 e 72 horas, em comparação com células não-transfetadas (controlo). Os ensaios foram realizados com um n = 3 e a análise estatística foi realizada com o teste two-way ANOVA. A significância estatística foi realizada com a comparação dos diferentes vetores em relação ao controlo e os resultados apresentam uma significância às 72H de P < 0,0001 (****) para os vetores terapêuticos em relação ao controlo. ....	66
Figura 40: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR das comparações do nível de transcritos de E6 entre as células HeLa (H), CaSki (C) e SiHa (S). ....	67
Figura 41: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR da comparação dos níveis de transcritos de E6 e E7 entre células não transfetadas (CT) e células 24 h após transfeção em células CaSki com os vetores mcDNA-primiR-375, mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado. ....	68
Figura 42: PCR quantitativo (RT-qPCR) da expressão média dos transcritos de E6 com cada um dos vetores em relação ao controlo. ....	69
Figura 43: PCR quantitativo (RT-qPCR) da expressão média dos transcritos de E6 com cada um dos vetores em relação ao controlo. ....	69
Figura 44: Representação esquemática da indução do vetor parental no vetor de mcDNA-conjugado com o lugar dos genes e respetivos promotores. ....	70

Figura 45: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR da comparação dos níveis de transcritos de p53 entre células não transfetadas (CT) e células 24H após transfeção em células CaSki com os vetores mcDNA-primiR-375, mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado. .... 70

Figura 46: PCR quantitativo (RT-qPCR) da expressão média dos transcritos de p53 com cada um dos vetores em relação ao controlo..... 71

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Genótipos de HPV detetados segundo o potencial oncogénico nas 43 mulheres com infecção por HPV, setembro de 2014-dezembro de 2016. ....	7
Tabela 2: Tipos de HPV de alto e baixo risco.....	8
Tabela 3: Principais funções e características dos produtos genéticos iniciais e tardios do HPV. ....	11
Tabela 4: Diferenças entre as oncoproteínas E6 e E7. ....	14
Tabela 5: Técnicas de separação de acordo com as diferentes propriedades das biomoléculas. ....	30



# Lista de Acrónimos

Ago - Proteína Argonauta

AV - Adenovírus

BM - Membrana Basal (“*Basement Membrane*”)

cDNA - DNA complementar

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

CDKs - Cinases Dependentes de Ciclinas

CIN - Neoplasia Intraepitelial Cervical (“*Cervical Intraepithelial Neoplasia*”)

DO<sub>600nm</sub> - Densidade ótica a 600 nm

dsDNA - DNA de cadeia dupla (“*double string*”)

E1-7 - Genes Iniciais (“*Early*”)

E2F - Fator de Transcrição

E6AP - Proteína Associada a E6 (“*E6 Associated Protein*”)

*E. coli* - *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Fase G - Fase de intervalo (“*Gap*”)

Fase M - Fase mitótica (“*Mitotic*”)

Fase S - Fase de síntese (“*Synthesis*”)

FBS - Soro fetal bovino

FDA - Food and Drug Administration

FW - Forward

gDNA - DNA genómico

HPV - Vírus do Papiloma Humano

HR-HPV - HPV de alto risco (“*High Risk*”)

HSIL - SIL de alto grau (“*High grade SIL*”)

ICC - Cancro Cervical Invasivo (“*Invasive Cervical Cancer*”)

L1 e L2 - Genes Tardios (“*Late*”)

LCR - Região Longa de Controlo (“*Long Control Region*”)

LR-HPV - HPV de baixo risco (“*Low Risk*”)

LSIL - SIL de baixo grau (“*Low grade SIL*”)

mcDNA - DNA minicircular

miRNA - MicroRNA

miRISC - Complexo silenciador induzido por miRNA

mP - Mini-plasmídeo

mRNA - RNA mensageiro

ncRNAs - RNAs não codificadores

nt - Nucleótidos

P - Probabilidade de significância

PBS - Phosphate Buffered Saline

PCR - Polymerase Chain Reaction

PP - Plasmídeo Parental

pRB - Proteína Retinoblastoma

pré-miRNA - MicroRNA precursor

pri-miRNA - MicroRNA primário

RISC - Complexo Silenciador Induzido por RNA

RNA - Ácido ribonucleico

RV - Reverse

RT-PCR - Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction

rRNA - RNA ribossômico

sc - Superenrolada

SCJ - Junção Escamo-Colunar (*“Squamocolumnar Junction”*)

SDS - Dodecil Sulfato de sódio

SIL - Lesão Intraepitelial Escamosa (*“Squamous Intraepithelial Lesion”*)

TAE - Tris-acetato-EDTA

TB - Terrific Broth

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

tRNA - RNA de transferência

UV - Ultravioleta



# Capítulo 1 - Introdução



## 1.1. A Célula

As células são as unidades básicas da vida e podem ser de dois tipos, células procarióticas e células eucarióticas. As células procarióticas consistem num compartimento fechado que está rodeado de membrana plasmática, não tem núcleo definido e tem uma organização interna relativamente simples, sendo a bactéria o mais comum destes organismos. As células eucarióticas, ao contrário das procarióticas, contêm um núcleo definido rodeado por uma membrana, uma região entre a membrana plasmática e o núcleo (o citoplasma) que compreende o citosol (fase aquosa) e os organelos. As células eucariotas abrangem todos os membros do reino das plantas e dos animais, incluindo os fungos e os protozoários [1].

A característica mais notável das células e organismos inteiros é a sua capacidade para se reproduzirem. O tipo de reprodução biológica mais simples engloba a divisão de uma célula “mãe” em duas células “filhas” (Figura 1). Este fenómeno ocorre como parte do ciclo celular através de uma série de eventos que preparam a célula para se dividir seguidos do efetivo processo de divisão, chamado de mitose. O ciclo da célula eucariótica representa-se em quatro fases. Os cromossomas e o DNA que eles transportam são copiados durante a fase de síntese (S - “*synthesis*”). Os cromossomas replicados são separados durante a fase mitótica (M - “*mitotic*”), ficando cada célula-filha com uma cópia de cada cromossoma durante a divisão celular. As fases S e M são separadas por duas fases de intervalo (G - “*Gap*”), G1 e G2, durante as quais são fabricados os RNAs mensageiros (mRNAs) e as proteínas [2].

Na maior parte das células proliferativas, as quatro fases do ciclo celular procedem com sucesso, levando entre 10-20 horas dependendo do tipo de célula e estado de desenvolvimento. Como é possível verificar pela figura 1, durante a interfase, que consiste nas fases G1, S e G2, a célula duplica praticamente a sua massa. A replicação do DNA durante a fase S deixa a célula com quatro cópias de cada tipo de cromossoma. Na fase M, os cromossomas são igualmente divididos em duas células “filhas” e o citoplasma divide-se praticamente ao meio na maior parte dos casos. Sob certas condições tais como fome ou quando um tecido chega ao seu tamanho final, as células param o ciclo e permanecem num estado de espera/repouso denominado G0. A maior parte das células na fase G0 podem reentrar no ciclo se as condições mudarem [3].

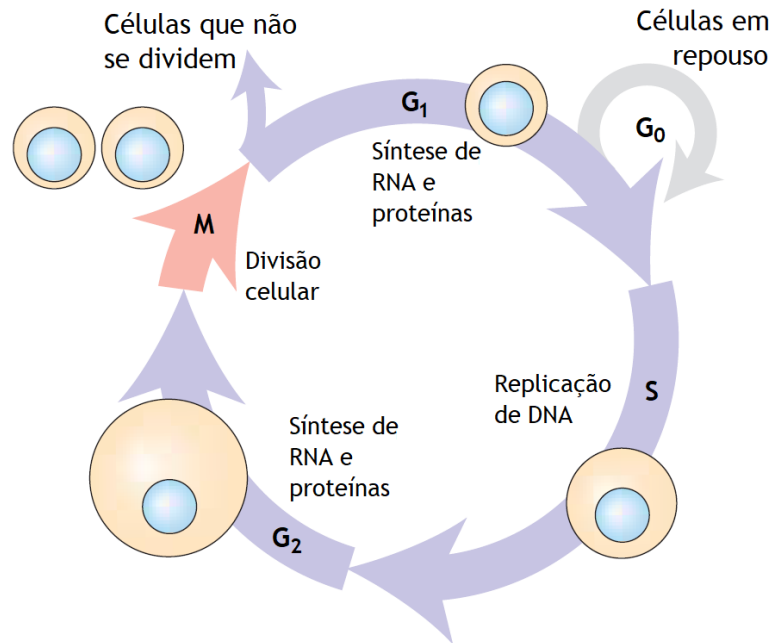


Figura 1: Representação esquemática do ciclo celular. Adaptado de [3].

Devido ao facto de as células do nosso organismo sofrerem constantes divisões, para que todo o processo ocorra corretamente, há um controlo dessa divisão por parte de certos supressores de tumor para evitar que células defeituosas se possam multiplicar e distribuir esses erros. Quando os erros são detetados, ocorre uma interrupção do ciclo celular e da proliferação e as células são levadas à morte celular programada/apoptose. No entanto, podem ocorrer mutações no DNA que muitas vezes invalidam os genes responsáveis pelo controlo de erros. Como consequência, estas células não morrem e continuam a proliferar descontroladamente, tornando-se imortalizadas e começando a criar metástases que se podem espalhar por todo o organismo usando o sistema circulatório e linfático.

## 1.2. Cancro

O cancro é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e oito milhões de mortes ocorrentes em 2012. Estes números deverão aumentar, com 22 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes relacionadas com o cancro a ocorrer anualmente até 2030. A magnitude crescente desta doença é uma consequência do crescimento populacional e do envelhecimento, mas as mudanças sociais, económicas e de estilo de vida ligadas ao aumento do desenvolvimento humano provavelmente irão aumentar ainda mais a escala e alterar o perfil do cancro nas próximas décadas [4].

O cancro é uma doença complexa que continua a desafiar drogas terapêuticas antigas e recém-aprovadas. A recaída de pacientes tratados e a inevitável mudança para a metástase destacam a complexidade adaptativa desta doença. Embora os mecanismos subjacentes à gênese e à progressão do cancro sejam melhor compreendidos do que nunca, os medicamentos terapêuticos que estão a ser desenvolvidos até o momento não levaram à cura de todos os pacientes. O dano colateral da quimioterapia e radiação e o inevitável aparecimento de resistência seguido de metástase é uma séria limitação da atual defesa contra o cancro [5].

### 1.2.1. Cancro do Colo do Útero

O cancro do colo do útero ou cancro cervical é uma preocupação séria de saúde da população feminina em geral e está classificado entre as quatro malignidades femininas mais comuns a nível mundial, com incidência em 527.624 mulheres por ano e com 265.672 mortes associadas. O cancro cervical constitui 4% de todos os cancros diagnosticados mundialmente. Quando se considera disparidades na saúde, este cancro é a terceira causa de morte mais comum para as mulheres que vivem em países menos desenvolvidos e com menos recursos. Na verdade, cerca de 84% dos casos deste tipo de cancro ocorrem em países menos desenvolvidos, com maior incidência em África, América Latina e Caraíbas, e com a menor incidência na América do Norte e Oceânia (figura 2) [6].

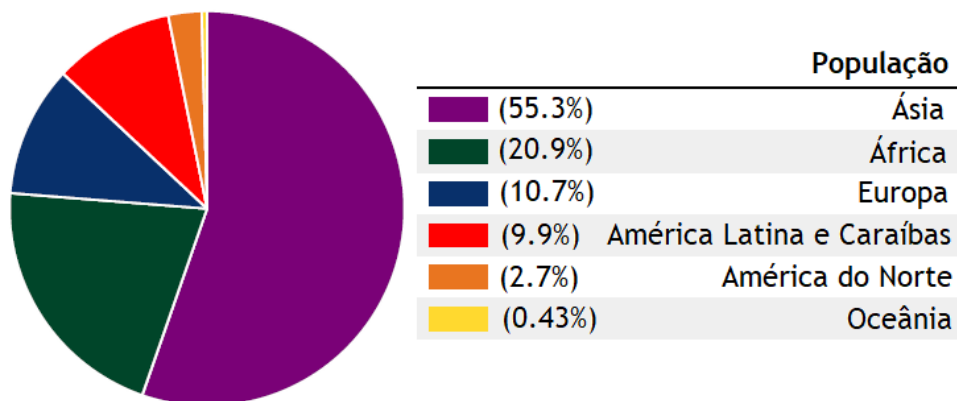


Figura 2: Incidência do cancro do colo do útero a nível global. Adaptado de [6].

Devido ao facto das lesões pré-cancerígenas poderem ser detetadas pelo exame de Papanicolau (Pap), tratadas e curadas, o cancro cervical é muitas vezes detetado antes de se atingir um estado avançado. A deteção antecipada tem levado à diminuição da incidência e taxas de morte, uma vez que as mulheres com lesões pré-cancerígenas tratadas têm uma taxa de sobrevivência muito elevada. Embora o rastreio possa prevenir o aparecimento do cancro cervical, nem todas as mulheres recebem os rastreios recomendados ou em tempo útil [7].

### 1.2.1.1. Incidência do Cancro Cervical na Europa e em Portugal

Como se pode observar pela figura 3, as taxas de incidência do cancro cervical na Europa são altamente variáveis. Repara-se que a incidência reportada em Portugal é alta quando comparada a taxa à da Finlândia, que é a mais baixa a nível Europeu. A introdução da vacinação contra o HPV na Europa poderia ajudar a reduzir as taxas de incidência do cancro cervical ainda mais. Neste sentido, em Portugal, desde 2008 que o Programa Nacional de Imunização para o HPV tem como alvo meninas de 13 anos, e apresenta um programa de acompanhamento para meninas de 17 anos, sendo aplicável por centros de saúde primários [8].

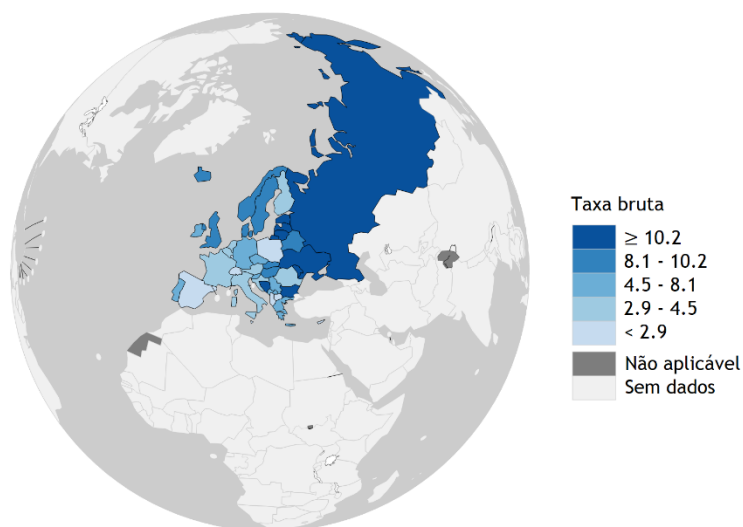


Figura 3: Taxas de incidência de cancro do colo do útero estimadas para 2018, em mulheres com idades compreendidas entre os 10 e os 34 anos. Adaptado de (<http://gco.iarc.fr/today>).

As lesões cervicais observadas pelos estudos dos papilomavírus, uma pesquisa na Europa (CLEOPATRE - “*Cervical Lesions Observed by Papillomavirus Types-A Research in Europe*”), têm como objetivo providenciar uma melhor compreensão da epidemiologia da infeção por HPV ao longo da Europa. Em Portugal, há uma necessidade específica de informação na distribuição dos tipos de HPV, particularmente entre mulheres jovens (idades <25 anos) nas quais o risco de infeção por HPV espera-se que seja maior [8].

Entre setembro de 2014 e dezembro de 2016 foram estudadas 152 mulheres jovens vacinadas, com atividade sexual ativa e idades compreendidas entre os 14 e os 30 anos, sendo a média de idades de 21 anos. Das 152 mulheres estudadas, 28,3% (43/152) apresentaram uma infeção por HPV, como se pode verificar na figura 4 [9].

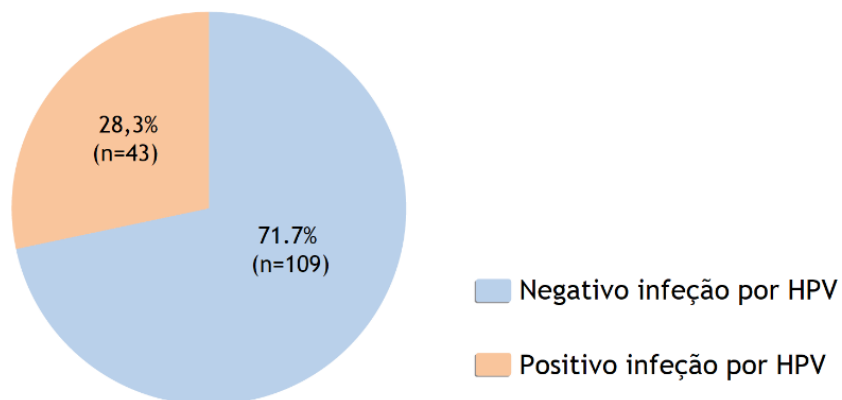


Figura 4: Distribuição dos casos infeção por HPV, setembro de 2014-dezembro de 2016. Adaptado de [9].

Das 43 mulheres positivas para a infeção por HPV, 58,1% (25/43) estavam infetadas com genótipos de alto risco. Em 41,8% (18/43) das mulheres foram identificados genótipos de possível alto risco e em 25,6% (11/43) verificou se a presença de genótipos de baixo risco [9]. Tais factos podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Genótipos de HPV detetados segundo o potencial oncogénico nas 43 mulheres com infeção por HPV, setembro de 2014-dezembro de 2016. Adaptado de [9].

		Total
Nº de mulheres estudadas		152
<b>Nº de mulheres infetadas por HPV</b>		<b>43</b>
<i>Genótipos de alto risco</i>	Nº de mulheres infetadas *	25
	%	58,1
<i>Genótipos de baixo risco</i>	Nº de mulheres infetadas *	11
	%	25,6
<i>Genótipos de possível alto risco</i>	Nº de mulheres infetadas *	18
	%	41,8
<i>Genótipos de risco indeterminado</i>	Nº de mulheres infetadas *	5
	%	11,6

\* as mulheres podem estar infetadas com mais de que um genótipo de HPV.

O vírus do papiloma humano ou papilomavírus humano (HPV) é considerado o vírus sexualmente transmissível mais comum a nível mundial e a principal causa de quase todos os casos de cancro cervical [7].

## 1.3. Vírus do Papiloma Humano (HPV)

### 1.3.1. Classificação do HPV

Os HPV's são vírus de DNA de cadeia dupla ("double-string" DNA - dsDNA), sem envelope, icosaédricos, circulares e com aproximadamente 55 nm de diâmetro [10]. Estes vírus são considerados epiteliotrópicos, o que significa que geram infeções produtivas maioritariamente dentro do epitélio estratificado da pele, cavidade oral e trato anogenital. A infeção de células epiteliares basais inicia o ciclo de vida do vírus, que está ligado à diferenciação das células epiteliares infetadas [11].

A infeção persistente com o HPV é o principal fator de risco no desenvolvimento de numerosas malignidades em humanos em vários sítios anatómicos, destacando-se o cancro do colo do útero como a doença de maior impacto. Embora sejam conhecidos 200 tipos de HPV capazes de infetar humanos, apenas uma pequena porção destes tem sido associada com desenvolvimento de cancro cervical. Em 1983, o primeiro tipo de HPV de alto risco (HPV16) foi descoberto por um virologista alemão e recebedor de prémio nobel (em 2008), Professor Harald zur Hausen, quando tentou encontrar semelhanças nas sequências de DNA entre pacientes com cancro cervical. Desde então, descobriram-se vários tipos de alto risco, com os HPV16 e 18, sendo os mais comuns em pacientes com carcinomas cervicais invasivos [12].

Os HPV's que infetam humanos são classificados em cinco géneros: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), mu ( $\mu$ ) e nu ( $\nu$ ), e os tipos  $\alpha$  e  $\beta$  tem sido os mais intensamente investigados [13]. Alguns  $\alpha$ -papilomavírus são responsáveis por infeções cutâneas e da mucosa: os tipos de alto-risco (HR - "High Risk") e os tipos de baixo risco (LR - "Low-Risk") [14]. As infeções virais LR são responsáveis por lesões benignas, comumente causadas pelos HPV-6 e HPV-11, enquanto que as infeções virais HR são responsáveis por lesões pré-malignas e malignas ao imortalizar os queratinócitos humanos. Destas, os HPV16 e HPV18 causam cerca de 80% do cancro cervical a nível mundial, enquanto que os restantes 20% são predominantemente associados com outros HR-HPV's como os HPV31, HPV33, HPV45 e HPV58 [13]. Na tabela 2 estão representados alguns exemplos de HPV's de alto e baixo risco.

Tabela 2: Tipos de HPV de alto e baixo risco. Adaptado de [15].

	Tipos de HPV's
HR-HPV's	<u>16</u> ; <u>18</u> ; <u>31</u> ; <u>33</u> ; 35; 39; <u>45</u> ; 51; 52; 53; 56; <u>58</u> ; 59; 66; 67; 68; 70; 73; 82; 83.
LR-HPV's	<u>6</u> ; <u>11</u> ; 42; 44; 54; 61; 62; 72; 81; 84; 87; 90; 91.

Os B-papilomavírus (tipos 5,9 e 49) são responsáveis por lesões cutâneas. As infeções existem na forma latente na população em geral e são ativadas sob condições de supressão imune. Os papilomavírus tipos  $\gamma$ ,  $\mu$  e  $\nu$  são também responsáveis por lesões cutâneas, podendo as lesões causadas por estes ser malignas ou benignas [14].

Ainda existem outros tipos de papilomavírus: delta ( $\Delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), zeta ( $\zeta$ ), eta ( $\eta$ ), theta ( $\theta$ ), iota ( $\iota$ ), kappa ( $\kappa$ ), lambda ( $\lambda$ ), xi ( $\xi$ ), ómicron ( $\omicron$ ) e pi ( $\pi$ ); sendo estes responsáveis por doenças em animais [14].

A vasta maioria da investigação de HPV focou-se no HPV16, o seu ciclo de vida replicativo e o seu papel no cancro do colo do útero [10]. Os genótipos HPV16 e HPV18 foram classificados como carcinogénicos humanos em 1995 pela Agência Internacional de Investigação no Cancro (“International Agency for Research on Cancer” - IARC). De forma geral, os tipos HR-HPV são considerados carcinogénicos e são constantemente associados com cancro cervical invasivo (“Invasive Cervical Cancer” - ICC) [11].

Normalmente os HR-HPV’s causam infeções transientes que são eventualmente tratadas no período de vários meses pelo sistema imune, pelo que o aparecimento de cancro não resulta de tais infeções. No entanto, com o passar do tempo, se ocorrerem mudanças no genoma viral, e/ou na célula hospedeira infetada, a infeção transiente pode tornar-se persistente e se esta não for detetada e removida pelo sistema imunitário, há a possibilidade de progressão para cancro. O cancro cervical é precedido por doença cervical, que é um resultado direto da infeção por HPV. A doença cervical é comum e costuma ser detetada pelo esfregaço de “Papanicolau” em que são retiradas células da superfície do cérvix e examinadas ao microscópio para detetar anormalidades: coilócitos (células que contém um núcleo comprimido com um vacúolo perinuclear), e células anormalmente divididas que podem indicar infeção por HPV [10].

A doença cervical é classificada num sistema de três estágios, denominado de “neoplasia intraepitelial cervical” (CIN - “*Cervical Intraepithelial Neoplasia*”) ou um sistema de dois estágios, denominado de “lesão intraepitelial escamosa” (SIL - “*Squamous Intraepithelial Lesion*”). A CIN é categorizada em CIN1, CIN2 e CIN3, havendo evidências da progressão de CIN1 a 3, ou de SIL de baixo grau (LSIL - “*Low grade SIL*”) para SIL de alto grau (HSIL - “*High grade SIL*”), subjacentes à formação de cancro cervical. Acredita-se que a CIN1 represente uma infeção transitória por HPV que tenha baixa probabilidade de progressão para o cancro do colo do útero, correspondente ao LSIL. A infeção por múltiplos tipos de HPV é muito comum em CIN1, mas é eventualmente eliminada num período de vários meses pelo sistema imunológico, sendo que aproximadamente 80-90% dos casos de CIN1 regridem. Quanto aos CIN2 ou CIN3 (HSIL), na maioria dos casos representam uma infeção persistente (figura 5), equivalente a doença pré-cancerígena, mas mesmo para CIN3, até 60% das lesões regridem

espontaneamente. As lesões de CIN de alto grau abrigam uma gama similar de HPVs anogenitais infecciosos aos encontrados no cancro do colo do útero [10].

As imagens da figura 5 mostram lesões cervicais coradas por hematoxilina e eosina. No lado esquerdo está representada uma secção de tecido com as camadas granular, espinhosa e basal indicadas para CIN1/LSIL. No lado direito é mostrada uma secção de tecido doente com o compartimento basal significativamente expandido indicando CIN3/HSIL. Os núcleos estão corados a roxo, os citoplasmas estão corados a rosa. Um coilócito típico (célula epitelial escamosa que sofreu várias alterações estruturais, que ocorrem como resultado da infeção da célula pelo papilomavírus humano) está indicado por uma seta. Uma lista de pontos de destaque de cada estágio da doença está apresentada abaixo de cada imagem. Uma lista de fatores que contribuem para a progressão da doença cervical é mostrada no fundo da imagem. A progressão de CIN1 para CIN3 deve-se à infeção persistente e regulação positiva da expressão das oncoproteínas E6 e E7 [10].

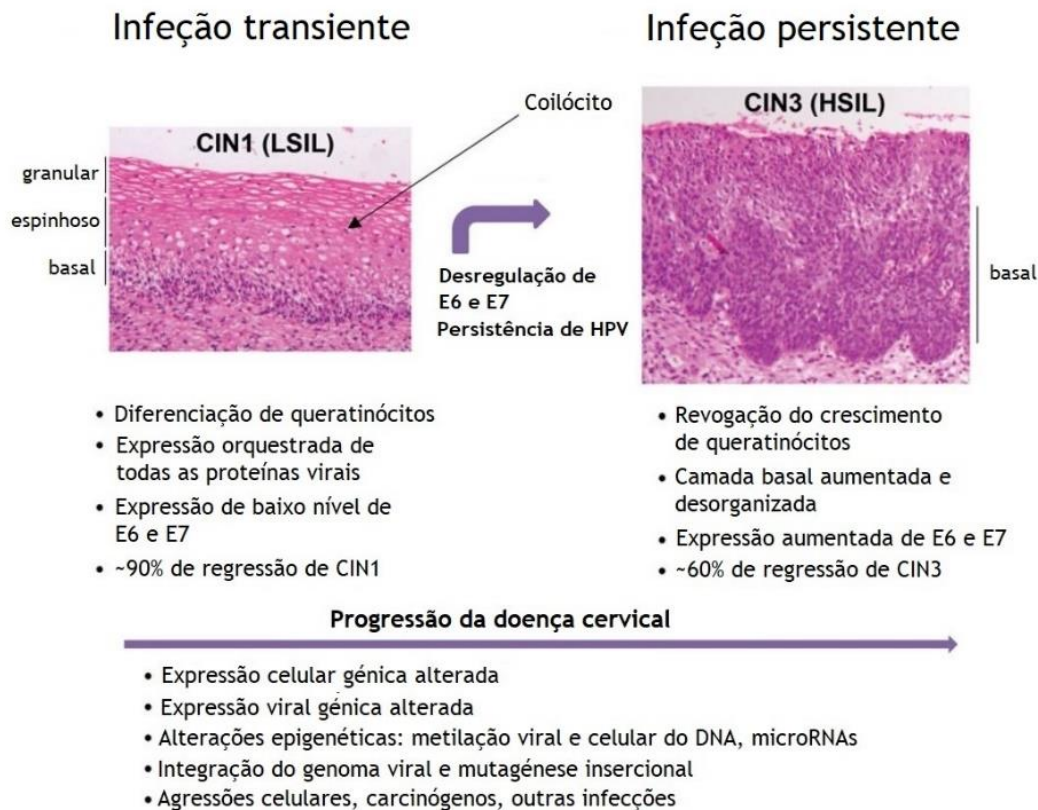


Figura 5: Progressão da doença cervical e listas de fatores contribuintes. Adaptado de [10].

#### 1.3.1.1. Genoma do HPV

Como podemos verificar pela figura 6, o DNA de dupla cadeia do genoma do HPV16 está representado por um círculo anotado com os números dos nucleótidos, existindo três regiões distintas: a região codificante de genes iniciais (“*Early*”, E1-7), correspondente ao promotor inicial P97; a região codificante de genes tardios (“*Late*”, L1 e L2), correspondente ao

promotor tardio P670; e a região longa de controlo (LCR - “*Long Control Region*”). Os genes E1, E2, E4-E7 codificam a replicação viral e as proteínas reguladoras, três dos quais (E5, E6 e E7) são considerados os oncogenes. Dependendo da sua função específica, os genes iniciais são expressos em diferentes estágios do ciclo de vida viral. Os genes tardios codificam duas proteínas estruturais envolvidas na formação da cápside viral, enquanto que a LCR contém elementos reguladores envolvidos no controlo da replicação e transcrição do DNA viral (tabela 3) [12].

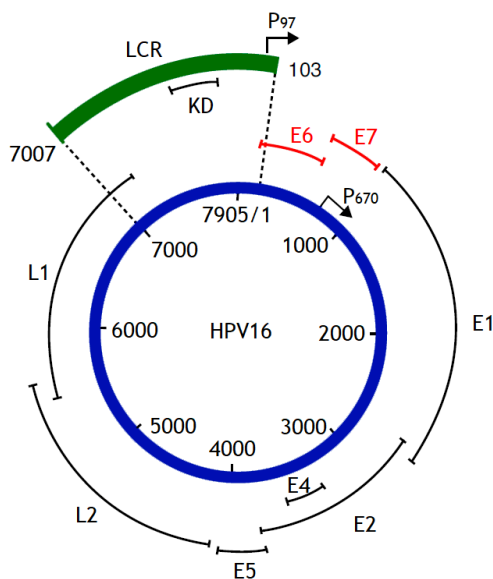


Figura 6: Organização do genoma do HPV16. Adaptado de [16].

Tabela 3: Principais funções e características dos produtos genéticos iniciais e tardios do HPV. Adaptado de [16].

<i>Gene Viral</i>	<i>Funções e Características</i>
<i>E1</i>	Replicação e Transcrição de DNA Viral
<i>E2</i>	Replicação de DNA Viral, Apoptose e Repressor Transcricional de E6/E7
<i>E4</i>	Replicação de DNA Viral
<i>E5</i>	Proliferação celular, alteração das vias de sinalização e apoptose
<i>E6</i>	Degradação de p53, alteração da regulação do ciclo celular, resistência à apoptose.
<i>E7</i>	Degradação da pRB, reentrada na fase S do ciclo celular
<i>L1</i>	Proteína de cápside maior
<i>L2</i>	Proteína de cápside menor

Após infeção das células na camada basal, E1 e E2 facilitam a replicação do genoma viral. Apesar do facto de que a integração do genoma do HPV pode ocorrer em lesões pré-malignas, a proporção de células que sofrem integração de HPV aumenta à medida que as células progredem em malignidade [12].

### 1.3.2. Ciclo de vida do HPV

O HPV ganha acesso a células estaminais da camada basal através de micro-lesões (figura 7) para se ligar preferencialmente à membrana basal (BM - “*Basement Membrane*”). Após o genoma viral chegar ao núcleo das células da camada basal, assume-se que seja inicialmente amplificado, tendo em conta que podem ser encontradas centenas de cópias do genoma viral em queratinócitos basais infetados. Após o estabelecimento da infeção, o número de cópias do genoma viral é mantido no compartimento basal para manutenção da replicação. A transcrição viral ocorre a uma taxa baixa e assume-se que a infeção se espalha através da divisão celular. Quando os queratinócitos armazenadores de HPV entram em diferenciação, a transcrição viral é ativada. Como será explicado no próximo tópico, nesta fase, a proteína E7, responsável por impedir as funções dos membros da família da pRB, permite às células armazenadoras de HPV que mantenham a competência do ciclo celular. A inativação da p53 pela proteína E6 impede a paragem do ciclo celular devido a replicação do DNA não programada. O ciclo de vida viral é completado após a expressão génica estrutural e montagem de viriões em células altamente diferenciadas das camadas mais altas do epitélio estratificado [17].

Pensa-se que a desregulação da expressão génica do HPV de alto risco depende de características específicas da célula epitelial basal que o vírus infeta, bem como da suscetibilidade desta célula infetada a estímulos externos, tais como hormonas e fatores de crescimento. A maior parte dos cancros cervicais aparecem na zona de transformação e adjacente ao endocérvix, uma região do colo do útero que compreende inicialmente o epitélio colunar, mas depois sofre metaplasia - particularmente na puberdade - para formar uma camada escamosa epitelial totalmente diferenciada. Pensa-se que as camadas estratificadas do ectocérvix são mantidas por células estaminais epiteliais “convencionais” que estão localizadas na camada basal. Por outro lado, pensa-se que as camadas estratificadas da zona de transformação, e a camada singular de células colunares que delimitam o endocérvix, são mantidas pela reserva de células cervicais. Embora as células de reserva sejam tipicamente abundantes nos sítios de metaplasia, estudos recentes sugeriram adicionalmente o envolvimento de um segundo tipo de células (tipo estaminais), com aparência cuboidal que estão localizadas mais precisamente na junção escamo-colunar (“*SCJ - squamocolumnar junction*”). Estes estudos sugerem que a infeção produtiva por HPV de alto risco é favorecida no ectocérvix e a formação de lesão começa a partir da infeção de uma célula estaminal epitelial (célula estaminal de reserva ou cuboidal) na zona de transformação ou endocérvix. Tal como se pode observar na figura 7, cujas imagens de imuno-histoquímica à

direita mostram um colo do útero normal, uma lesão clínica de baixo grau (CIN1) e uma lesão de alto grau (CIN3) [18].

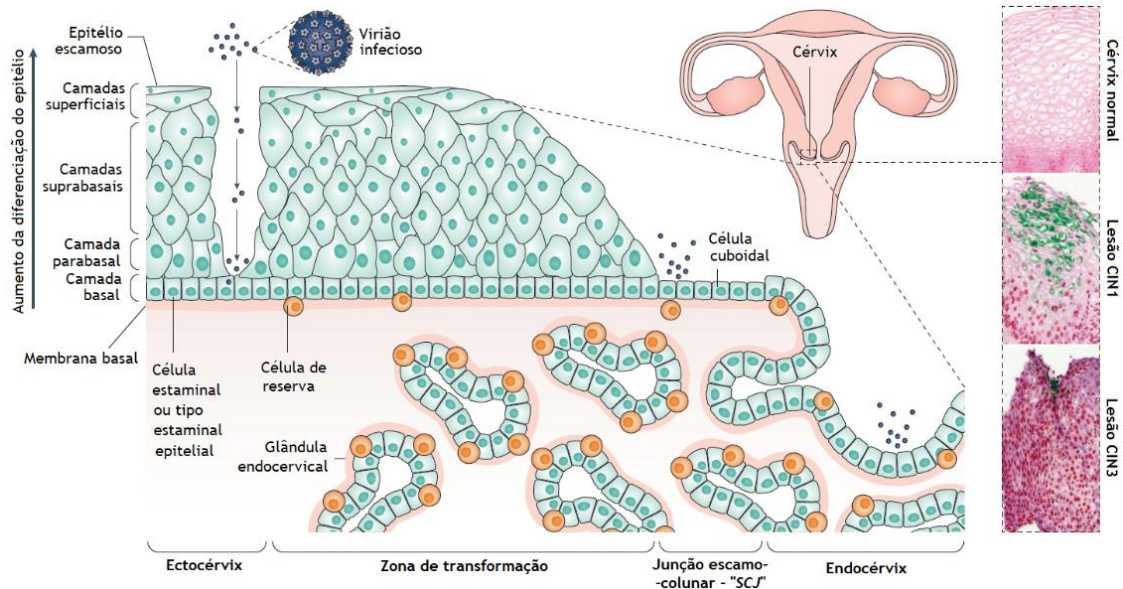


Figura 7: Infecção pelo HPV e a zona de transformação. Adaptado de [18].

### 1.3.3. Oncogenes Virais

Embora todos os genes codificados pelo genoma do HPV sejam cruciais durante diferentes estágios de replicação e do ciclo de vida viral, os dois genes de alto risco mais importantes são o E6 e o E7, também conhecidos como os oncogenes virais chave. Eles foram denominados oncogenes virais devido aos seus alvos na célula e as implicações das suas desregulações [12].

#### 1.3.3.1. Genes E1 e E2

O gene E1 do HPV codifica uma proteína helicase, essencial para a iniciação da replicação de DNA viral. Este gene é expresso nos estágios iniciais da infecção viral dentro das células hospedeiras. A expressão de E2 também ocorre numa fase inicial da infecção de HPV, a sua sobre expressão reativa a via supressora de tumor e inibe a expressão dos oncogenes E6 e E7. Se a expressão de E2 for perdida, deixa de haver inibição da expressão das oncoproteínas E6 e E7 [19].

#### 1.3.3.2. Genes E6 e E7

Os produtos dos genes E6 e E7 mostraram ser os principais responsáveis pelo processo de transformação celular. Tem sido proposto que a integração do HPV no genoma do hospedeiro ocorre após uma quebra no gene E2, que tem sido descrito como o principal repressor da expressão dos oncogenes E6 e E7. Essa quebra resulta na perda da repressão desses oncogenes, cujas proteínas interferem na função das proteínas celulares supressoras de tumor

p53 e pRb, respectivamente. Esses oncogenes influenciam direta e indiretamente as vias celulares, como apoptose, proliferação, crescimento e motilidade, e a sua ativação pode levar ao aparecimento da tumorigênese [19].

As proteínas E6 e E7 são relativamente pequenas com um comprimento de aproximadamente 150 e 100 aminoácidos, respectivamente, dependendo do tipo de HPV. Elas não são conhecidas por terem atividades enzimáticas, mas sim como manipuladoras da célula hospedeira ao formarem complexos com proteínas celulares (tabela 4). Análises recentes de interatividade levaram à identificação de centenas de novas proteínas celulares que poderiam interagir com as E6 e E7 [20].

Tabela 4: Diferenças entre as oncoproteínas E6 e E7. Adaptado de [18].

<b>Função</b>	<b>Oncoproteína E6</b>	<b>Oncoproteína E7</b>
<i>Ligação da ubiquitina ligase</i>	Interage com a ubiquitina ligase E6AP	-
<i>Transativação e acetilação da p53</i>	Inibe	-
<i>Apoptose</i>	Inibe	-
<i>Paragem de crescimento</i>	Ignorada após dano no DNA	-
<i>Diferenciação de queratinócitos</i>	Inibe	-
<i>Resposta do Interferão</i>	Inibe	-
<i>Ligação e degradação</i>	p53	pRB
<i>Entrada no ciclo celular e síntese de DNA</i>	-	Induz
<i>Instabilidade do genoma</i>	-	Induz
<i>Imortalização e transformação</i>	-	Tem um papel
<i>Papel na amplificação do genoma viral</i>	-	Sim

O papel das oncoproteínas E6 e E7 em inativar as vias supressoras de tumores p53 e pRb, respectivamente, são de extrema importância para a carcinogênese ligada ao HPV. Na figura 8 estão representados dois exemplos:

- a proteína E6 do HR-HPV16 interage com o motivo LXXLL da E6AP (proteína associada a E6), o que induz mudanças conformacionais, gerando um espaço para a ligação de p53 e a formação de um complexo trimérico E6/E6AP/p53, resultando na degradação proteolítica da p53 pela via da ubiquitina;
- as proteínas E7 cutâneas e da mucosa dos tipos HR-HPV têm um motivo LXCXE que medeia a interação com o gene pRb supressor de tumor (e a E7 do HPV16 promove um complexo Cullin2-RING ubiquitina ligase), como consequência, a pRB é degradada pela via proteossomal, e os fatores de crescimento E2Fs ativos e livres estimulam a expressão de genes que codificam reguladores positivos do ciclo celular [16].

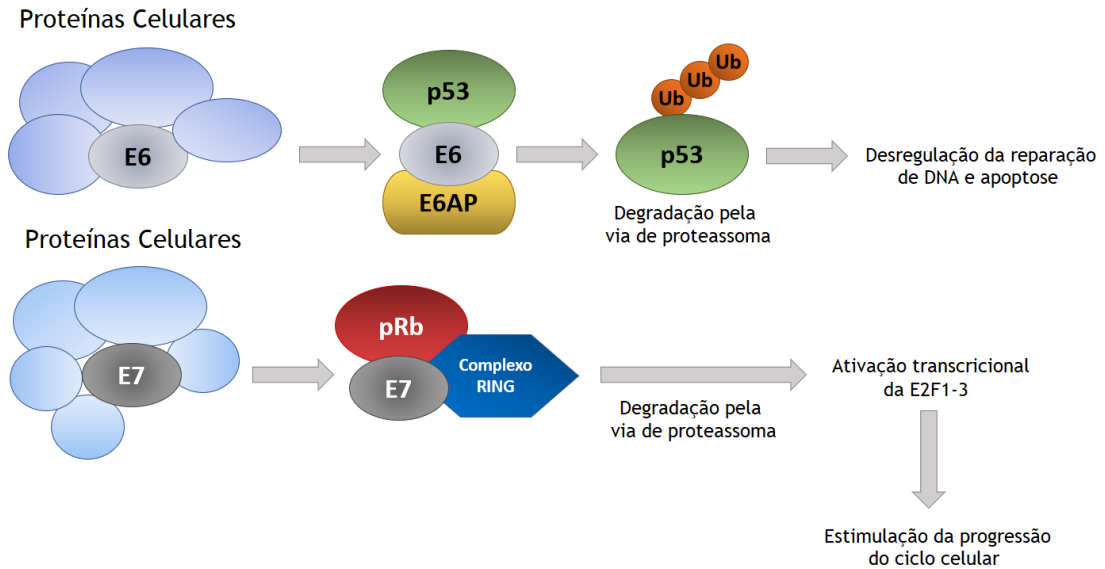


Figura 8: Representação esquemática dos mecanismos de ação das oncoproteínas E6 e E7 do HPV. Adaptado de [16].

A atividade transformante da E7 é fortemente aumentada quando a E6 é co expressa. Pela figura 9 verificamos que a expressão sozinha da oncoproteína E7 do HPV leva à desregulação da proliferação celular ao inativar a pRB (e outros fatores), o que pode ser contrariado pela apoptose induzida pela p53, eliminando assim as células com crescimento desregulado (parte de cima da imagem). A expressão conjunta da E6 induz a degradação proteolítica da p53 via formação de um complexo trimérico E6/ E6AP/p53. Consequentemente, a resposta apoptótica em direção a E7 é bloqueada, permitindo o desenvolvimento das células sob estímulos de crescimento anormais exercidos pela E7 (parte de baixo da imagem) [20].

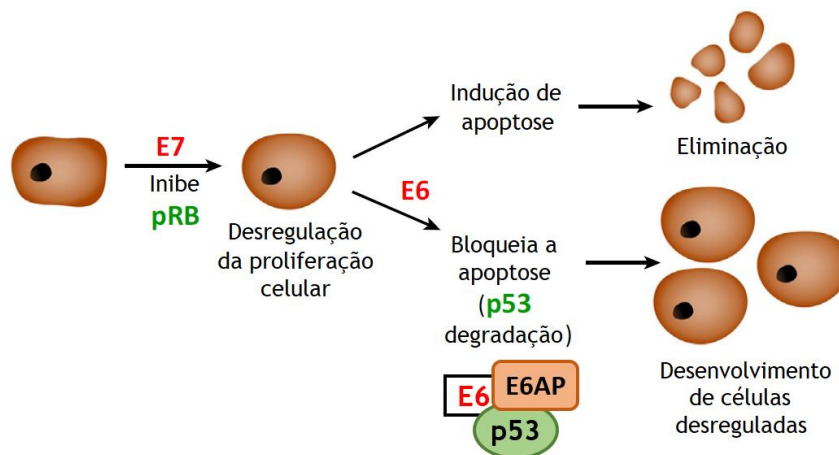


Figura 9: Modelo da cooperação entre as oncoproteínas E6 e E7 do HPV durante a transformação de células malignas. Adaptado de [20].

Os cancros relacionados com o HPV são um grande problema de saúde a nível mundial, pelo que se torna crucial entender completamente os mecanismos oncogénicos envolvidos no seu desenvolvimento. Os avanços nas tecnologias permitiram a identificação de vários alvos moleculares das proteínas E6 e E7. Estas oncoproteínas têm a capacidade de prejudicar várias vias regulatórias importantes. Embora as abordagens terapêuticas convencionais como: cirurgia, quimioterapia e radioterapia; permaneçam como base do tratamento de pacientes com cancro, além dos efeitos secundários, a resistência e a recorrência dos tumores são frequentemente observadas, diminuindo a esperança e qualidade de vida dos pacientes. Assim, ferramentas de edição genómica tais como terapia génica para editar oncogenes virais e tratar malignidades relacionadas com o HPV precisam de ser estudadas mais aprofundadamente [21].

## 1.4. Terapia Génica

A terapia génica envolve a transferência de ácidos nucleicos para células somáticas com objetivo de tratar desordens genéticas em humanos. Neste tipo de terapia, os genes causadores de doença são removidos ou substituídos por genes normais funcionais para reestabelecer a função enzimática ou proteica do organismo. Espera-se que a doença seja eliminada após aplicação de uma terapia génica. Este tipo de terapia pode incluir sistemas de entrega de genes com base em sistemas virais, sistemas não-virais (tais como vetores de DNA, polímeros, péptidos, lipossomas catiónicos ou nanopartículas capsulares) e métodos físicos (tais como a eletroporação e ultrassons) [22].

A terapia génica tem demonstrado grande potencial para o tratamento de várias doenças graves. Hoje em dia, construir sistemas de entrega de genes eficientes e seguros é um grande desafio para a terapia génica clínica. Embora os vetores virais consigam mediar a transfeção génica com elevada eficiência, as respostas imunes adversas, a integração arriscada no genoma e o tamanho limitado do gene carregado dificultam a sua posterior aplicação [23].

Embora o conceito de terapia génica exista há muitas décadas, a investigação clínica começou em 1990, quando o primeiro estudo clínico, para uma desordem imunodeficiente rara, foi elaborado nos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA. Desde então, mais de 2.500 estudos clínicos têm sido iniciados para uma extensa gama de aplicações, desde uma variedade de doenças monogénicas para doenças infecciosas, desordens degenerativas complexas e cancro (figura 10) [24].

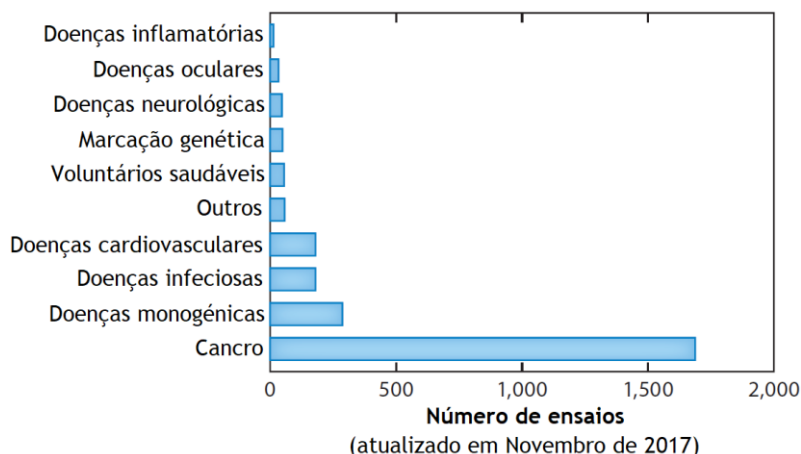


Figura 10: Indicações em ensaios clínicos de terapia génica. O gráfico de barras classifica os estudos clínicos de transferência génica por doença. Adaptado de [24]

O potencial deste campo para o tratamento de doenças "incuráveis" resultantes de mutações herdadas levou os investigadores a concentrarem os seus esforços na busca pela próxima cura "milagrosa". Embora sua popularidade tenha sido afetada devido à ameaça representada por algumas reações adversas graves que ocorreram em alguns estudos clínicos iniciais e como resultado da falta de resultados terapêuticos significativos, nos últimos anos, mais esforços foram feitos no desenvolvimento de estratégias de terapia génica adequadas ao tratamento do cancro [25]. De facto, a maioria dos ensaios clínicos de terapia génica realizados até o momento foi direcionada ao tratamento do cancro (65%) [26]. Portanto, tem havido um interesse crescente no estudo de proteínas supressoras de tumor no desenvolvimento de tais estratégias. Por exemplo, a pRB é uma proteína supressora de tumor, cuja ação é inibida devido à atividade viral do HPV, mais precisamente à expressão da oncoproteína E7. Sendo que a sua função está principalmente envolvida na regulação da proliferação do ciclo celular através da inativação do fator de transcrição E2F [25].

Em 2001, Ip e colaboradores desenvolveram um estudo de terapia génica para avaliar o potencial terapêutico de um adenovírus (AV) que expressa pRB. No entanto, os seus resultados sugeriram que a pRB não é adequada para o desenvolvimento de uma terapia de cancro cervical porque nenhum efeito inibitório foi encontrado no crescimento de três linhas celulares diferentes do cancro do colo do útero. Além disso, eles também avaliaram o uso de um AV que expressava p53 nas mesmas linhas celulares, e neste caso foi detetada a apoptose destas células por citometria de fluxo [27]. A principal razão da diferença desses resultados provavelmente está relacionada com o facto da suplementação de p53 ativar uma via de sinalização responsável pela indução da apoptose, enquanto que a pRB está principalmente envolvida na regulação da proliferação celular e não necessariamente na contribuição para a morte celular [28]. No entanto, os fracos resultados obtidos com o protocolo de terapia génica baseado em pRB para o tratamento do cancro do colo do útero levaram essa estratégia ao esquecimento. Por outro lado, o gene p53 foi considerado o principal gene supressor de

tumor escolhido para o desenvolvimento de estratégias de terapia génica, por vezes combinadas com outras terapias convencionais, como quimioterapia ou radioterapia [26]. Embora 50% dos casos de cancro em todo o mundo resultem de mutações no gene p53, tornando a proteína incapaz de regular a proliferação celular e ativar a cascata de apoptose, no cancro cervical, a p53 é degradada devido à presença de oncoproteína viral E6 [25].

A restauração dos níveis de p53 pode ser uma estratégia adequada para induzir a apoptose de células tumorais, o que pode ser conseguido através da transfeção de células malignas com um vetor de expressão de p53. O uso de tal estratégia tem sido controverso de acordo com a literatura, uma vez que alguns investigadores afirmam que esse tipo de terapia génica pode não ser completamente eficaz devido à degradação da proteína p53 mediada por E6 [29].

Para superar esse problema e evitar a ação direta do E6 sobre a p53 expressa pelo vetor de terapia genética, em 1998, Prabhu e colaboradores publicaram um estudo sobre o desenvolvimento de um AV que poderia expressar p73B, um homólogo da proteína p53 que exibe funções supressoras de tumor semelhantes [29]. Essa proteína pode induzir apoptose de maneira dependente da p53, mas geralmente é expressa em níveis baixos, porque a sua ativação geralmente é uma resposta ao stress. No estudo, as células que expressam HPV-E6 foram transfetadas com AV que expressava p53 ou p73B. A proliferação celular foi suprimida apenas nas células transfetadas com p73B-AV, em oposição às células transfetadas com p53-AV. Além disso, p73B-AV exibiu indução de apoptose em células transfetadas, sugerindo que os mecanismos E6 responsáveis pela degradação de p53 são incapazes de interferir na sinalização de p73B [29].

Em 2003, essas descobertas foram sustentadas por um estudo realizado por Das e colaboradores, onde desenvolveram um p73B-AV não replicante para fins de biossegurança e compararam a sua eficiência com um p53-AV, registando dados muito semelhantes aos relatados anteriormente por Prabhu [30,31]. Em 2006, Das et al. deu continuidade à investigação e publicou um estudo baseado no uso de p73B-AV não replicante *in vitro* e *in vivo* [31]. A inibição do crescimento de células cancerígenas do colo do útero positivas para HPV foi realizada com a administração deste produto biofarmacêutico, seguido pela indução de apoptose, em modelos *in vitro* e *in vivo*. No geral, esses resultados sugeriram que o p73B pode ser uma estratégia promissora para os cientistas encontrarem um tratamento de cancro induzido pelo HPV da próxima geração. No entanto, nenhuma informação nova sobre o uso desse vetor foi divulgada até o momento.

Apesar dos estudos desenvolvidos por Prabhu e Das, outros investigadores continuaram a explorar o uso da terapia génica de p53 no cancro cervical induzido pelo HPV e foram obtidos bons resultados. De facto, Gendicine foi o primeiro produto de terapia génica a ser comercializado para tratamento de cancro, cuja aprovação foi restrita à China, e consiste num AV recombinante que expressa a proteína p53 humana [33,34]. Doze anos desde o seu

lançamento no mercado, mais de 30.000 pacientes receberam esse medicamento biofarmacêutico como tratamento contra o cancro. Até o momento, nenhuma reação adversa grave foi relatada, exceto febre alta nas primeiras horas após o tratamento [34]. No entanto, a sua aprovação noutros países foi controversa, porque a metodologia usada para a recolha de dados na China não era comparável à utilizada pela FDA (“*Food and Drug Administration*”) [34]. No caso particular do cancro do colo do útero, foi demonstrado que a coadministração de Gendicine com radioterapia resultou num aumento significativo da taxa de sobrevivência em 5 anos em comparação à radioterapia isolada [33].

O objetivo mais direto da terapia génica para doenças genéticas é a expressão a longo prazo do gene transferido a níveis elevados o suficiente para ter efeito terapêutico ao longo do tempo, uma abordagem às vezes chamada de terapia génica de aumento. O gene transferido é frequentemente uma cópia normal de um gene mutado. Pode-se também suprimir a expressão de um gene prejudicial empregando-se RNA’s de interferência ou ferramentas de edição de genoma. É teoricamente possível, embora ainda não em ensaios clínicos, usar as técnicas de edição de genoma para corrigir um gene mutado na sua localização genómica precisa através de recombinação homóloga com um doador modelo ou via edição de bases (figura 11) [24].

O objetivo do aumento de gene é restaurar a função celular normal ao fornecer uma cópia funcional de um gene. Exemplos desta abordagem incluem o tratamento de doenças *in vivo* e o tratamento de imunodeficiências primárias *ex vivo* (figura 11a). Noutro tipo de casos, a função celular é perdida como resultado de acumulação tóxica de uma proteína defeituosa. A supressão genética tem a finalidade de restaurar a aptidão celular ao reduzir a expressão dos genes mutados via RNA de interferência (figura 11b). Enquanto que a edição de genoma não requer necessariamente o uso de uma nuclease, a eficiência da edição específica de genes em células de mamíferos é tipicamente aumentada pela indução de uma quebra de cadeia dupla de DNA no local alvo. A escolha de um mecanismo de reparo de DNA sobre outro vai determinar o resultado da edição do genoma. Na sua forma mais simples, após ocorrer a clivagem de DNA, a quebra é reunida por junção de extremidades não-homólogas, o que pode resultar em “*knock-down*” do gene se o reparo for imperfeito. Na presença de um modelo exógeno codificante de um gene funcional, o reparo de DNA pode resultar em correção *in situ* do gene mutado via recombinação homóloga. Um terceiro resultado potencial é a inserção do modelo de DNA via junção de extremidades não-homólogas, o que vai resultar em adição de gene ao invés de correção (figura 11c) [24].

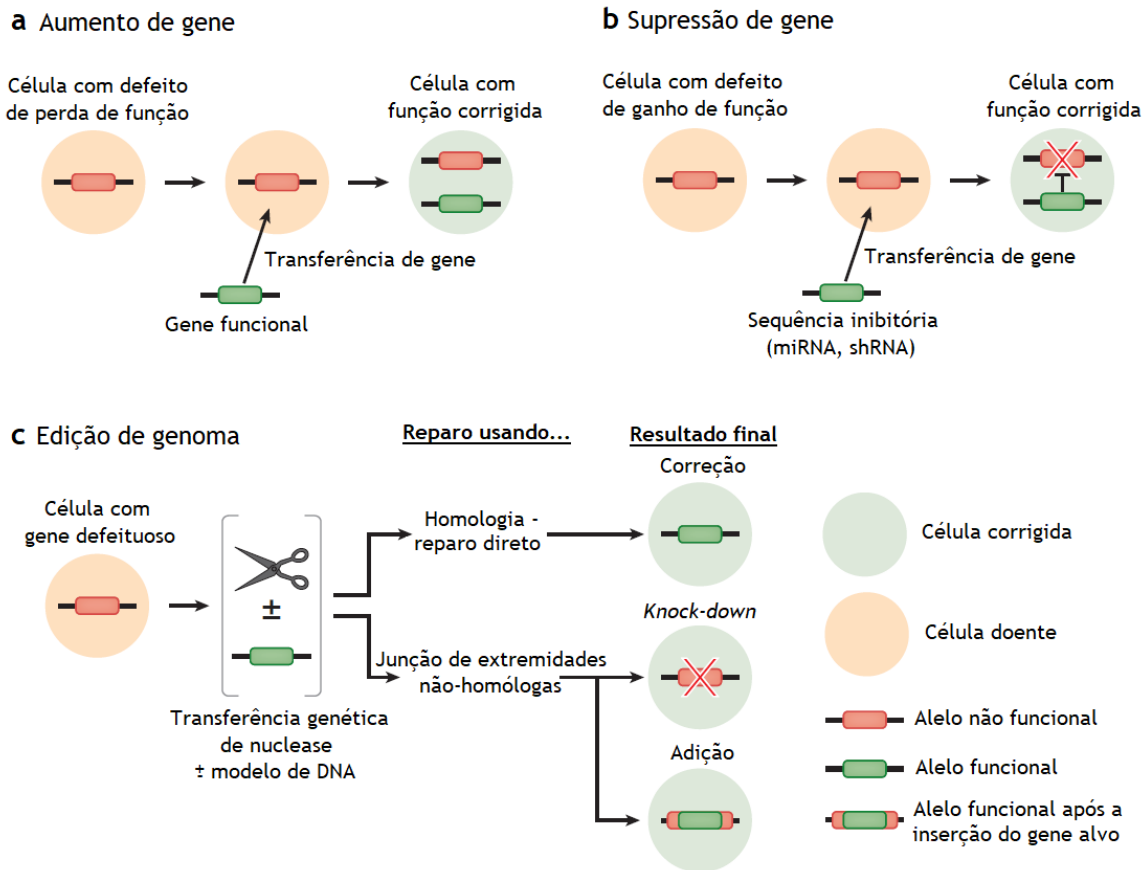


Figura 11: Tipos de terapia génica. Adaptado de [24].

### 1.4.1. Proteína RB (pRB)

A proteína RB (pRB) é uma proteína multifuncional que participa em vários processos moleculares. A sua função clássica é bem conhecida pela sua capacidade de reprimir a transcrição, que por sua vez regula a progressão do ciclo celular e a proliferação celular, ao regular o fator de transcrição E2F [35]. Na fase G1, a pRB pode ser fosforilada pelas cinases dependentes de ciclinas (CDKs) 4 e 6, sendo que quando está fosforilada não se consegue ligar ao fator de transcrição E2F [36]. Consequentemente, o E2F não ligado à pRB liga-se aos promotores e induz a expressão de vários genes-alvo, o que permite às células progredirem para a fase S do ciclo celular (figura 1) [37]. Numerosos genes são expressos em altos níveis dependentes de E2F aquando da inativação da pRB [35].

A inativação funcional da pRB compromete a capacidade das células para responderem a sinais que normalmente suprimem a proliferação conduzindo a uma divisão celular descontrolada. Pensa-se que as lesões que levam à inativação funcional da pRB ocorrem na maior parte das células cancerígenas, criando um ambiente celular que é permissivo à proliferação celular descontrolada [35].

## 1.4.2. Proteína 53 (p53)

A proteína p53, nomeada devido ao seu peso molecular, foi descoberta por David Lane em 1979. Alguns anos depois, o gene p53 foi denominado “o guardião do genoma” devido à sua capacidade de inibir o cancro ao manter várias funções celulares. A p53 existe como uma proteína nuclear tetramérica que pode interagir com várias proteínas diversas ou com DNA, cujas interações são reguladas por modificações pós-translacionais e podem contribuir para a estabilização da p53 ao bloquear a ubiquitinação. O gene p53 pode ser induzido por diversos sinais, tais como danos no DNA, privação de nutrientes, choque térmico, infecção viral, mudança de pH, hipoxia e ativação de oncogenes [38].

O gene p53 codifica uma proteína nuclear com 393 aminoácidos que consiste em cinco domínios funcionais: um domínio N-terminal de transativação com um número de sítios de fosforilação cruciais para a estabilização proteica, um domínio rico em prolina, um núcleo de ligação ao DNA que também está envolvido na ligação proteína-proteína, um domínio C-terminal de tetramerização e um domínio regulador. Mais de 80% das mutações somáticas detetadas nos tumores humanos afetam o domínio de ligação ao DNA (figura 12) [39].

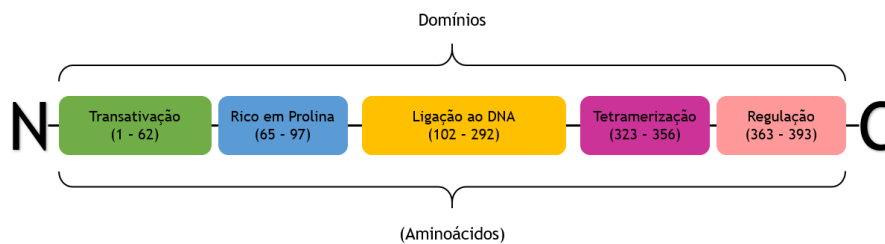


Figura 12: Domínios da p53. Adaptado de [39].

A proteína supressora de tumor p53 funciona maioritariamente, mas não exclusivamente, como um fator de transcrição estritamente regulado que engloba ambas atividades de transativação e transrepressão. A p53 tem a capacidade de regular a expressão de várias centenas de genes, muitos dos quais estão envolvidos em mediar ou regular o crescimento celular, divisão, sobrevivência e/ou a morte celular programada. Sob condições homeostáticas normais, a p53 é uma proteína de curta duração que é regulada maioritariamente através de mudanças na sua estabilidade proteica. Contudo, em resposta a uma gama de estímulos de stress, incluindo oncogenes ativados (hiperproliferação), stress ribossomal e várias formas de dano no DNA, a p53 é induzida, essencialmente por bloqueio da sua degradação, levando a um aumento nos seus níveis celulares. Elevados níveis de p53 promovem, dependendo do contexto, resultados biológicos de paragem de crescimento, senescência ou apoptose, que são mecanismos supressores de tumor largamente aceitáveis que bloqueiam a proliferação descontrolada de células transformadas ou eliminam-nas completamente (figura 13). A p53 também tem sido demonstrada por regular negativamente a

geração de novos vasos sanguíneos (angiogênese), uma contribuição chave para a supressão de tumor [40].

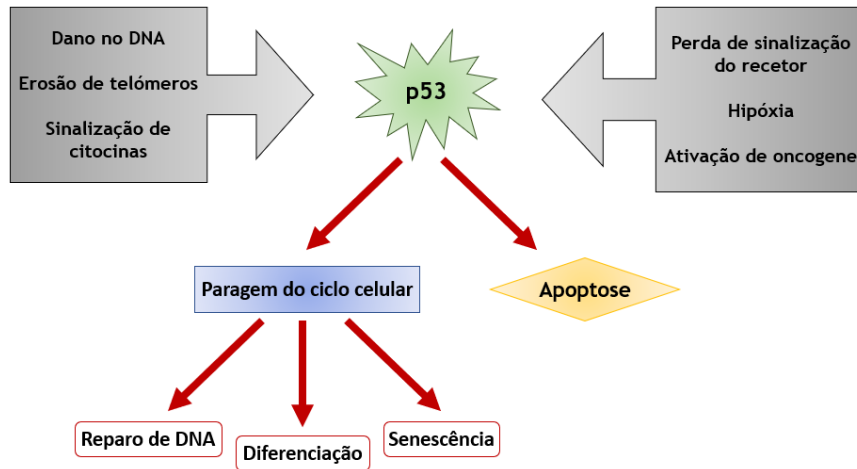


Figura 13: Papel central da p53 na resposta celular ao stress. A p53 determina o destino da célula após múltiplos sinais de stress exógenos e endógenos. Adaptado de [39].

Entre as diferentes abordagens direcionadas para a restituição da p53, as terapias génicas têm sido extensivamente exploradas nos recentes anos. Tais estratégias têm o objetivo de restaurar a função da p53 nas células cancerígenas através da introdução de genes de p53 exógenos. Vários protocolos e vetores têm sido empregados, incluindo retrovírus, adenovírus e vacinas derivadas de vetores [39].

### 1.4.3. Micro RNAs (miRNAs)

Sabe-se há décadas que apenas 3% do genoma humano codifica proteínas, e a maioria do nosso DNA foi anteriormente considerada pouco mais do que "lixo" [41]. No entanto, a nossa compreensão do transcrito humano mudou fundamentalmente nos últimos anos. Em 2012, o projeto Enciclopédia de Elementos do DNA (ENCODE - "Encyclopedia of DNA Elements") revelou que até 75% do genoma humano é transcricionalmente ativo, e é evidente que os RNAs não codificadores (ncRNAs) compreendem uma proporção substancial do transcrito humano [42]. Os ncRNAs são uma classe de moléculas de RNA funcionais sem características de codificação de proteínas. Os primeiros subtipos de ncRNA, RNA ribossômico (rRNA) e RNA de transferência (tRNA) foram descobertos na década de 1950 e, desde então, uma grande variedade de diferentes ncRNAs foi identificada [43].

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de RNAs endógenos, de cadeia dupla não codificantes e pequenos (17-25 nucleótidos, tipicamente 22 nucleótidos) que estão envolvidos na regulação da expressão gênica no nível pós-transcricional. Os miRNAs foram primeiro descobertos na *Caenorhabditis elegans* em 1993 e desde então foram descritos como sendo altamente conservados em quase todos os organismos. Nos humanos, os miRNAs fazem parte de apenas aproximadamente 1% do genoma humano, mas estima-se que eles regulem a transcrição e estabilidade de até 50-60% dos RNAs mensageiros (mRNAs), demonstrando a importância das suas funções na expressão gênica [44].

As aberrações na expressão de miRNAs podem ter consequências severas e estar ligadas à patogênese de uma vasta gama de doenças humanas. A via canônica de biogênese dos miRNAs é caracterizada por dois eventos-chave: são processados pela enzima RNase III Drosha no núcleo e digeridos adicionalmente pela enzima RNase III facilitada pela Dicer no citoplasma. O miRNA maduro é então funcionalizado por incorporação no complexo silenciador induzido por RNA (RISC - “*RNA Induced Silencing Complex*”) compreendendo uma proteína Argonauta (Ago) e vários fatores auxiliares (figura 14) [43].

Através da figura 14 é possível observar que os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II como pri-miRNAs longos (> 1 kb) e são processados em pré-miRNAs de 70 nucleótidos (nt) pelo complexo microprocessador, que consiste da enzima RNase III, Drosha, e da proteína de ligação a RNA, DGCR8. Os hairpins dos pré-miRNAs são então exportados para o citoplasma via Xpo5 (Exportina 5), onde são posteriormente processados por outra enzima RNase III, Dicer, que cliva o “*loop*” terminal do “*hairpin*”, deixando assim um duplex de miRNA. O duplex de miRNA é desenrolado e a cadeia guia madura é ligada por proteínas Argonauta (Ago1-4) e carregada no complexo miRISC (complexo silenciador induzido por miRNA). De seguida, o miRNA carregado guia o miRISC para mRNAs com complementaridade de sequência parcial nas suas 3' regiões não traduzidas (UTRs - “*Untranslated Regions*”) e induz o decaimento do mRNA ou a repressão da tradução [43].

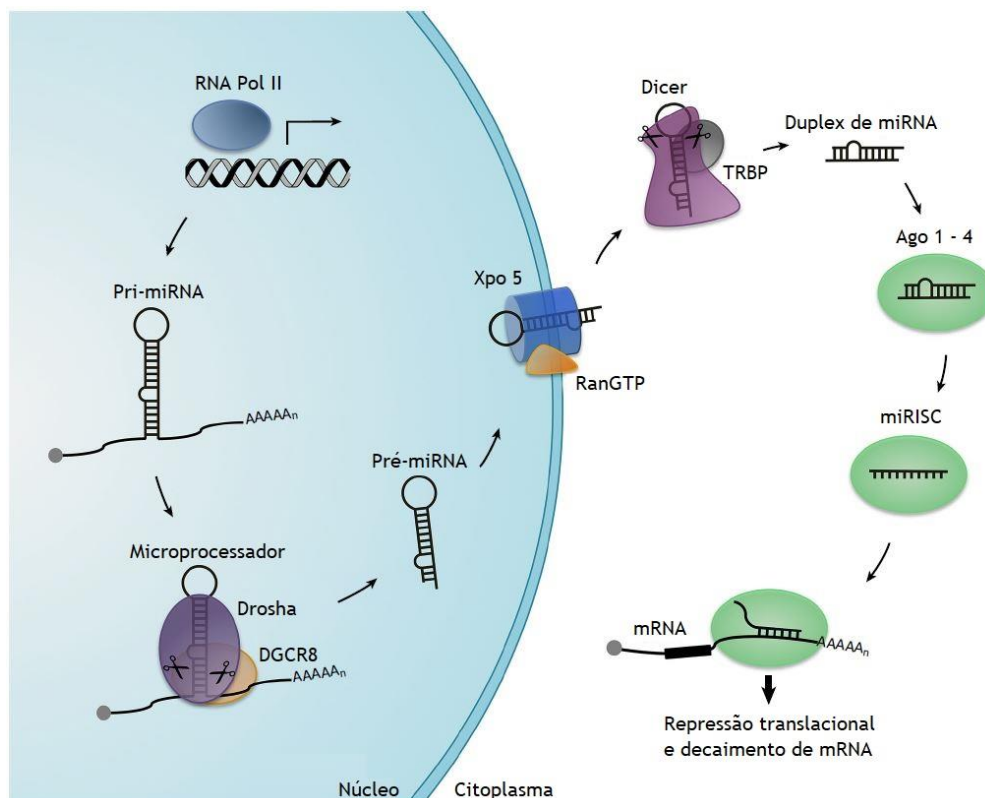


Figura 14: Representação da via canônica de biogênese de miRNAs. Adaptado de [43].

#### 1.4.3.1. Micro RNA 375 (miR375)

Os miRNAs têm sido identificados como importantes reguladores na tumorigênese e progressão do cancro através de várias vias moleculares [45]. Até à data, o pri-microRNA-375 (primiR-375) é o miRNA melhor caracterizado no desenvolvimento e funções celulares das células da endoderme pancreática e células β. É um dos poucos miRNA específicos de tecido caracterizados e controla a secreção de insulina induzida por glucose [46].

Num estudo por Wang *et al.* foi examinada a expressão de miR375 em tecidos de cancro cervical e investigada a sua função na proliferação, migração e invasão das células cervicais cancerígenas. O miR375 poderá atuar como um supressor de tumor e servir como um potencial alvo terapêutico no cancro cervical [45]. Neste estudo células SiHa e CaSki foram transientemente transfetadas com um miR375 mutado, que induziu uma supra-regulação significativa do miR375 comparada com o controlo negativo. A proliferação das células SiHa e CaSki após a transfeção foi significativamente reduzida. Mostrou-se que a superexpressão do miR375 causou uma paragem significativa em G2, sugerindo que o miR375 elevado bloqueia a transição da fase G1 para a fase S e consequentemente inibe a progressão do ciclo celular nas células cancerígenas cervicais. Os resultados indicaram que o miR375 serviu como supressor de tumor e contribuiu para a inibição da migração e invasão de células de carcinoma cervical [45].

Como reportado pelos estudos acima referidos, o miR375 tem sido associado com o desenvolvimento de cancro; este miRNA encontra-se infra-regulado em algumas malignidades. Alguns resultados de interação do miR375 com as oncoproteínas E6 e E7 sugerem que o miR375 desempenha um papel na metástase e progressão do cancro cervical como supressor de tumor [45].

#### 1.4.3.2. Interação entre o miR375 e as oncoproteínas E6 e E7

No estudo de Jung *et al.*, mostraram que o miR375 suprime as oncoproteínas E6, E7 e E6AP de HPV de alto risco (figura 15). Este estudo demonstrou o comportamento do miR375 como supressor de tumor miRNA ao resgatar os supressores de tumor maioritários, suprimindo componentes oncogénicos e, assim, regulando o ciclo celular e atividade da telomerase [47].

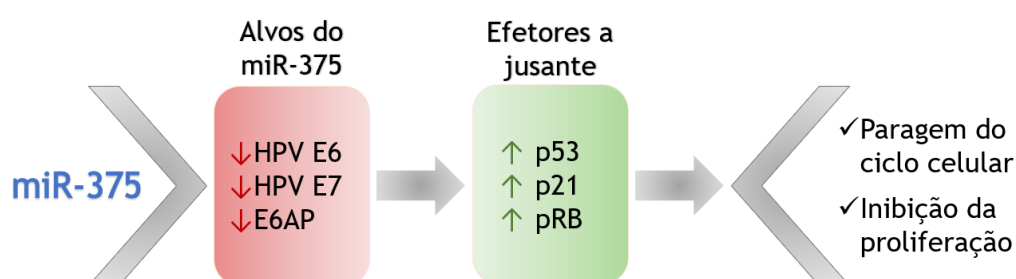


Figura 15: Efeitos do miR375 nos seus alvos e consequentes alterações celulares que daí provêm. Adaptado de [47].

Neste estudo usaram células SiHa e HeLa que são sistemas modelo representativos para estudar os tipos HPV16 e HPV18, porque são conhecidas por conter p53 e pRB *wild type*, respetivamente. Para examinar o efeito ajusante da regulação mediada pelo miR375 dos transcritos de HPV e da E6AP, foi avaliada a expressão de supressores de tumor cruciais relacionados com estas vias. Nas células SiHa, a transfeção com miR375 mutado aumentou os níveis das proteínas p53 e pRB. Curiosamente, o p21, que é um enorme influenciador ajusante na supressão de tumor mediada pela p53, mostrou níveis muito elevados de proteína em células transfetadas com miR375 e este aumento pode ser explicado pelo aumento dos níveis de proteína p53. O aumento das proteínas p53 e pRB não foi um resultado de ativação transcricional dos genes correspondentes, mas sim uma consequência da supressão de E6 e E7 mediada por miR375. Comparando as células transfetadas com miR375 com o controlo (células não transfetadas), foi observada uma diminuição significativa na proliferação celular [47].

Como reportado anteriormente, o mRNA dos genes E6/E7 do HPV é alvo de múltiplos microRNAs, incluindo o miR375, em células cervicais cancerígenas. Para confirmar o efeito alvo, He *et al.* transfetaram miR375 em células HeLa. Os resultados mostraram que os níveis dos mRNAs E6 e E7 do HPV18 foram reduzidos significativamente. Consequentemente, a expressão das proteínas E6 e E7 do HPV18 foram também reduzidas pelos miR375.

Similarmente, em células CaSki, os miR375 suprimiram a expressão de genes de HPV16 tanto ao nível do mRNA como ao nível de proteína. Estes resultados suportam o facto que o miR375 é capaz de silenciar os genes HPV16/18 nas células cancerígenas do colo do útero. Para confirmar adicionalmente os efeitos de direcionamento do miR375 para o HPV16/18, foram transfetados em células HeLa e CaSki inibidores do miR375. Os resultados mostraram que os genes HPV16/18 E6 e E7 e os níveis de mRNA foram supra regulados [48].

Recentemente, a terapia génica tem sido extensivamente explorada para o tratamento de várias doenças. Embora vetores baseados em vírus sejam capazes de introduzir elevados níveis de expressão de transgenes, a aplicação clínica é limitada pela imunogenicidade e genotoxicidade. Assim, os vetores não-virais à base de DNA surgem como alternativas promissoras e mais seguras. O DNA minicircular (mcDNA) é considerado um vetor genético de nova geração proveniente do DNA plasmídico, que contém uma cassette de expressão circular livre de sequências bacterianas. Possui uma excelente expressão sustentada a longo prazo de transgenes e biossegurança [49].

## 1.5. DNA minicircular (mcDNA)

### 1.5.1. DNA plasmídico (pDNA)

O DNA plasmídico (pDNA) bacteriano tem sido considerada nos últimos anos uma biomolécula promissora para a transferência genética, existindo vários estudos e ensaios clínicos atualmente em progresso a nível mundial. Esta escolha é comumente apoiada pela segurança relativa do pDNA em comparação com vetores baseados em vírus e devido ao baixo risco de integração de material genético no genoma do hospedeiro. Para ser produzido em bactérias recombinantes e ao mesmo tempo expressar o seu gene terapêutico de interesse (GOI - “*Gene Of Interest*”), o “*backbone*” do pDNA deve incluir: uma origem de replicação bacteriana (bac-ORI); um gene de resistência a antibiótico (ex. kanamicina) para evitar a propagação de bactérias livres de plasmídeo; e finalmente uma unidade de transcrição que contém um promotor eucariótico, o GOI e uma sequência poli-adenilada (polyA) para aumentar a expressão do GOI e resistência a nucleases. O pDNA é tipicamente mantido como uma entidade episomal que é fisicamente desapegada e replicada independentemente do DNA cromossómico do hospedeiro. Mesmo com este benefício excepcional, a translação de biofarmacêuticos padrão de pDNA das clínicas para os pacientes permanece altamente comprometida pelos seus níveis de expressão relativamente baixos e carácter transiente. Neste contexto, têm sido exploradas recentemente outras biomoléculas com objetivo de ultrapassar estes problemas, nomeadamente a geração de pequenas cassetes plasmídicas, denominadas de DNAs minicirculares (mcDNA) [50].

### 1.5.2. Classificação do mcDNA

A terapia gênica atraiu muita atenção para programar ou melhorar funções celulares. Embora os vírus sejam dos mais eficientes portadores de genes, problemas incertos como imunogenicidade, limitação da capacidade portadora de gene e dificuldades de fabrico são ainda obstáculos para a sua aplicação clínica [51].

Os vetores de DNA minicircular (mcDNA) são classificados como vetores de expressão genética não-virais, episomais e fechados covalentemente, geralmente biossintetizados em bactérias recombinantes que consistem em “backbones” minimalísticos com potencial para atender aos requisitos clínicos para expressão genética segura e de longa duração. De uma perspectiva histórica, estes vetores foram inicialmente reportados por Cameron e Schleef, numa patente preenchida em 1995 e que permanece ativa atualmente [52]. Nesta invenção, os mcDNAs são originalmente definidos como uma tecnologia permissora para transferência genética para células de mamíferos e é reivindicada como sendo constituída por uma matriz única de características que incluem:

- i) uma isoforma topológica superenrolada inerente;
- ii) a falta de qualquer bac-ORI;
- iii) a ausência de qualquer sequência codificadora para resistência antibiótica;
- iv) a existência de um transgene terapêutico cuja expressão é controlada por um promotor de mamífero; e
- v) a existência de uma sequência específica atribuída ao local de recombinação onde o plasmídeo parental (PP) precursor produz o mcDNA (figura 16) [50].

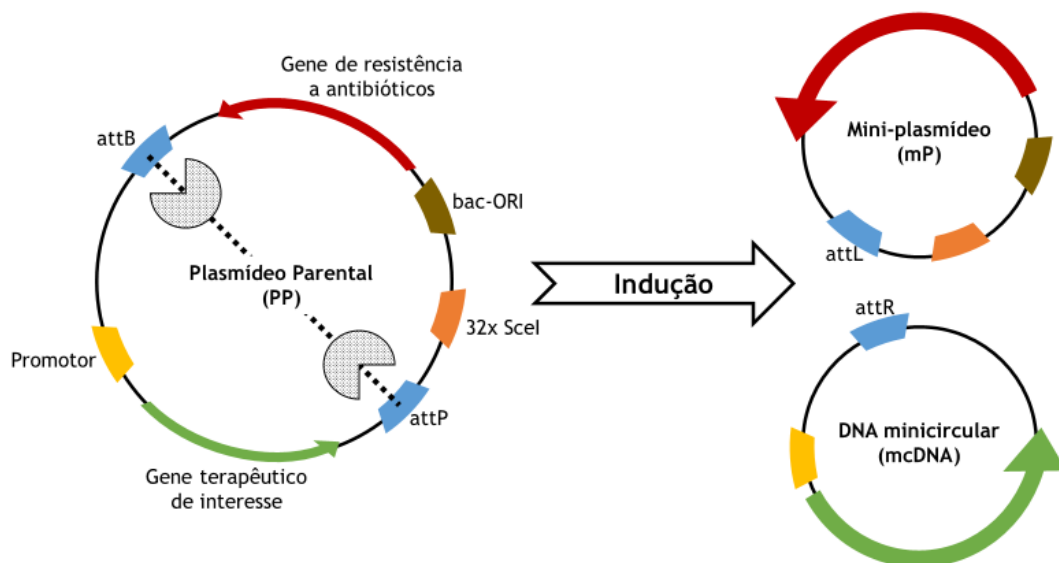


Figura 16: Esquema representativo da produção do vetor de DNA minicircular (mcDNA) a partir do plasmídeo parental (PP). Adaptado de [53]

O DNA minicircular (mcDNA), um tipo de vetor não viral novidade, é preparado sem o “backbone” bacteriano do plasmídeo tradicional. Assim, o mcDNA tem muitas características de destaque, incluindo baixa imunogenicidade e excelente expressão de transgenes. Contudo, a biodisponibilidade do mcDNA é limitada pela liberação rápida *in vivo* ou pela degradação por nucleases nos lisossomas celulares [51]. Recentemente, esta tecnologia tem sido notavelmente melhorada com os desenvolvimentos relatados por Kay *et al.* que se concentram maioritariamente no uso de uma estirpe de *Escherichia coli* (*E. coli*) geneticamente modificada que gera mcDNAs por recombinação *in vivo* específica do local. Esta estratégia permite a remoção de espécies excedentes de plasmídeo parental (PP) e mini-plasmídeo (mP) que resultam do processo de recombinação [54]. Considerando que ambos os vetores PP e mP envolvem a sequência bac-ORI e os marcadores de resistência a antibióticos, a sua eliminação subsequente por endonucleases *homing* durante a amplificação bacteriana é uma melhoria valiosa [50].

Comparado com plasmídeos regulares, o mcDNA possui um tamanho menor sem as sequências bacterianas prejudiciais permitindo uma eficiência aumentada em reduzir respostas imunes e prolongar a expressão de transgenes *in vitro* e *in vivo* [23]

### 1.5.3. Produção de mcDNA

Após a amplificação de PP por um processo normal de fermentação da bactéria hospedeira, a fase de indução é estimulada pela adição de um indutor (por exemplo, L-arabinose) que promove a expressão da maquinaria celular responsável pela conversão das moléculas de PP em mcDNA. No início da indução, todos os elementos necessários para a conversão de precursores de PP em vetores minicirculares são ativamente expressos e começam a gerar os biofármacos de interesse - fase de recombinação. A recombinação específica do local é uma metodologia particularmente bem estabelecida e constitui o princípio subjacente para a geração de mcDNA a partir dos seus modelos parentais. Este método permite a excisão, integração ou troca de segmentos de DNA exatos (30 a 40 pb, ou maiores), que são locais de ancoragem híbridos específicos (por exemplo, attB e attP) para recombinases específicas do local (enzimas bacteriófagas que medeiam a reação de troca nestes substratos). Uma vez que as recombinases reconhecem os locais híbridos e ligam-se a eles nas moléculas de PP, a troca/recomposição de cadeias é promovida, sendo gerados ambos os vetores mcDNA e mP. Cada um dos vetores resultantes contém dois novos locais híbridos (por exemplo, attR e attL), respectivamente (figura 16) [50].

#### 1.5.3.1. Integrase do Fago Lambda ( $\lambda$ -Int)

A integrase do fago lambda ( $\lambda$ -Int) é uma recombinase de tirosina que catalisa a recombinação conservativa. A sua função intrínseca é executar a integração do genoma do fago lambda no seu hospedeiro alvo. Em relação à produção de mcDNA, o sistema  $\lambda$ -Int foi o

primeiro método usado para gerar esses biofármacos, no qual a  $\lambda$ -Int reconhecia os sítios de hibridação attP e attB. No entanto, a toxicidade intrínseca deste sistema no hospedeiro bacteriano originou baixos rendimentos de recombinação de PP - mcDNA (de 40 a 70%). Consequentemente, uma quantidade significativa de moléculas de PP não convertidas permanece (contamina) a preparação final [55].

#### 1.5.3.2. Recombinação causada (Cre) pela recombinase do Fago P1

Ao contrário do sistema  $\lambda$ -Int, a recombinase Cre cataliza uma recombinação bidirecional específica do local quando se liga aos seus sítios de hibridação loxP. No entanto, a aplicação do sistema Cre-loxP na produção de vetores minicirculares só seria possível inibindo a bidirecionalidade. Assegurar uma recombinação unidirecional é crucial na produção de vetores minicirculares para evitar que as espécies de mcDNA e mP sejam recombinadas para produzir novamente o seu modelo PP. Assim, apesar de ter sido utilizada uma estratégia elegante de mutação de metade de um sítio de ligação loxP (enquanto o complementar permaneceu normal) para garantir a unidirecionalidade do sistema Cre-Int, o rendimento de conversão de PP para mcDNA não foi absoluto, resultando à presença de plasmídeos residuais no lote final. A existência de contaminantes compromete severamente a aplicabilidade clínica destes biofármacos uma vez que pode despoletar uma resposta imunológica infecciosa ao paciente [55].

#### 1.5.3.3. ParA resolvase

ParA é uma serina recombinase da família das enzimas resolvases/invertases e catalisa uma recombinação intramolecular específica do local, irreversível e conservativa, quando se liga a um plasmídeo alvo superenrolado, contendo dois sítios de ligação híbridos. A ParA resolvase é muito adequada para a produção de vetores minicirculares de DNA em hospedeiros bacterianos porque é altamente eficiente em mediar estes eventos recombinacionais durante a amplificação bacteriana. Para produção de mcDNA, o gene ParA é inserido no genoma bacteriano sob o controlo do sistema indutível L-arabinose. Usando uma tecnologia de separação de plasmídeos baseada em recombinação (RBPS - “*Recombination-Based Plasmid Separation*”), Mayrhofer *et al.* conseguiram uma eficiência de recombinação PP-mcDNA superior a 99.5%, uma atividade enzimática notável que contribui para a aplicabilidade deste sistema na produção em grande escala. De um ponto de vista razoável, torna-se claro que, em comparação com os sistemas de recombinação anteriores (Cre e  $\lambda$ -Int), a tecnologia RBPS é uma plataforma mais promissora para a produção e purificação de biofármacos de mcDNA de nível clínico em larga escala [56].

#### 1.5.3.4. Sistema recombinase $\phi$ C31/endonuclease I-Scel

A integrase  $\phi$ C31 da *Streptomyces* bacteriófaga ( $\phi$ C31-int) é uma serina recombinase que medeia eventos de recombinação unidirecional entre os seus sítios de ligação attP/attB (-40

pb), através de domínios catalíticos e de ligação ao DNA que controlam todo o processo [55]. Ao contrário de outras recombinases,  $\phi$ C31-int não requer nem isoformas superenroladas nos seus substratos, nem a assistência de fatores hospedeiros complementares como no caso de  $\lambda$ -Int. A simplicidade relativa do sistema  $\phi$ C31-int estimulou o seu uso extensivo em aplicações terapêuticas avançadas. Este sistema também foi explorado para produção de mcDNA em bactérias recombinantes, mas era necessária a remoção de vetores de mP e PP residuais e, assim, foi criada uma tecnologia de aproveitamento de endonucleases *homing* I-SceI para eliminar ambas as espécies. Mais recentemente, esta tecnologia de produção de vetores minicirculares num só passo foi aprimorada pela modificação genética de uma estirpe de *E. coli* (ZYCY10P3S2T), que permitiu obter elevadas quantidades de mcDNA com 10 vezes menos plasmídeos contaminantes (0.4 a 1.5% de resíduos) [50].

Gaspar *et al.* desenvolveram uma otimização adicional da produção de mcDNA aumentando a temperatura de crescimento bacteriano para 42 °C no sentido de aumentar a biossíntese de PP e conseqüentemente obter um maior rendimento de mcDNA [57].

#### 1.5.4. Purificação - Princípios da Cromatografia

As biomoléculas são purificadas usando técnicas que separam de acordo com diferenças em propriedades específicas (tabela 5). A figura 17 representa um esquema das técnicas cromatográficas descritas na tabela 5.

Tabela 5: Técnicas de separação de acordo com as diferentes propriedades das biomoléculas.

<i>Propriedade</i>	<i>Técnica</i>
Bio-reconhecimento (especificidade do ligando)	Cromatografia de afinidade
Carga	Cromatografia de troca iônica
Hidrofobicidade	Cromatografia de Interação Hidrofóbica Cromatografia de Fase Reversa
Tamanho	Cromatografia de Exclusão Molecular ou Filtração em Gel

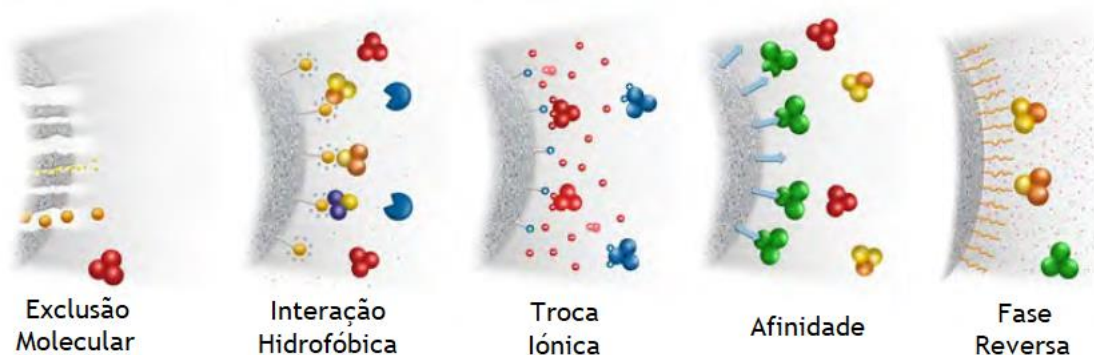


Figura 17: Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia. Adaptado de [58]

#### 1.5.4.1. Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade (AC - “*Affinity Chromatography*”) separa proteínas com base numa interação reversível entre uma proteína (ou grupo de proteínas) e um ligando específico acoplado a uma matriz de cromatografia. Esta técnica oferece alta seletividade e resolução, permitindo uma purificação da molécula alvo com elevados níveis de recuperação, mantendo a sua atividade biológica. A AC é a única técnica de cromatografia que permite a purificação de uma biomolécula com base na sua função biológica ou estrutura química individual [59].

As interações biológicas entre o ligando e a molécula alvo podem ser resultado de interações eletrostáticas, hidrofóbicas, forças de Van der Waals e/ou pontes de hidrogénio. Para eluir a molécula alvo, a interação pode ser destabilizada, usando especificamente um ligando competitivo ou inespecificamente, alterando o pH, a força iónica ou a polaridade. As moléculas alvo podem ser purificadas a partir de misturas biológicas complexas, as formas nativas podem ser separadas das formas desnaturadas da mesma substância e pequenas quantidades de material biológico podem ser purificadas a partir amostras complexas com altos níveis de impurezas. Algumas interações biológicas típicas entre a molécula-alvo e o seu respetivo ligando, frequentemente usadas na AC, estão listadas abaixo:

- Anticorpo ⇔ antígeno, vírus, célula;
- Iões metálicos ⇔ proteínas marcadas com histidina (his);
- Glutationa ⇔ glutationa-S-transferase ou proteínas marcadas com GST;
- Enzima ⇔ substrato análogo, inibidor, cofator;
- Lectina ⇔ polissacarídeo, glicoproteína[59].

#### 1.5.4.2. Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia de troca iónica (IEX - “*Ion Exchange Chromatography*”) foi introduzida na década de 1960 e continua a desempenhar um papel importante na separação e purificação de biomoléculas. Hoje, a IEX é uma das técnicas mais usadas para purificação de proteínas,

péptidos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas carregadas, oferecendo alta resolução. A técnica é capaz de separar espécies moleculares que possuem apenas pequenas diferenças nas suas propriedades de carga, por exemplo, duas proteínas que diferem num aminoácido carregado. Esses recursos tornam a IEX bem adequada para as etapas de captura ou purificação intermediária, e esta técnica é usada desde a purificação e análise em microescala até a purificação de quilogramas de produto [60].

#### 1.5.4.3. Cromatografia de Interação Hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC - “*Hydrophobic Interaction Chromatography*”) é amplamente utilizada na purificação de proteínas como complemento de outras técnicas que se separam de acordo com a carga, tamanho ou reconhecimento bioespecífico. Esta técnica é recomendada quando a biomolécula alvo tem predominância de grupos hidrofóbicos, quando as amostras foram submetidas à precipitação com sulfato de amónio (frequentemente usado para concentração e limpeza inicial da amostra) ou após a separação por cromatografia de troca iónica. Nas duas últimas situações, a amostra contém uma alta concentração de sal e pode ser aplicada diretamente na coluna HIC com pouca ou nenhuma preparação adicional. O nível elevado de sal ajuda a expor os grupos hidrofóbicos, favorecendo a interação entre os componentes hidrofóbicos da amostra e os ligandos cromatográficos. Em alguns casos de separação, as amostras são purificadas e eluídas em volumes menores, concentrando assim a amostra para que ela possa ir diretamente para a filtração em gel ou, após uma troca de tampão, para uma separação de troca iónica [61].

#### 1.5.4.4. Cromatografia de Fase Reversa

A cromatografia de fase reversa (RPC - “*Reversed Phase Chromatography*”) é ideal para aplicações como mapeamento de péptidos ou verificação de pureza e é frequentemente usada para o polimento final de oligonucleótidos e péptidos. A RPC separa as moléculas de acordo com as diferenças na sua hidrofobicidade. Em teoria, HIC e RPC são técnicas estreitamente relacionadas, pois são ambas baseadas em interações entre regiões hidrofóbicas na superfície das biomoléculas e as superfícies hidrofóbicas da fase estacionária. No entanto, na prática, as técnicas são muito diferentes. A superfície de um meio RPC é geralmente mais hidrofóbica do que a de um meio HIC. Isso leva a interações mais fortes que, para uma eluição bem-sucedida, devem ser revertidas usando solventes orgânicos não polares, como acetonitrilo ou metanol. Os meios HIC oferecem uma maneira alternativa de explorar as propriedades hidrofóbicas das biomoléculas, trabalhando num ambiente mais polar e menos desnaturante [62].

#### 1.5.4.5. Cromatografia de Filtração em Gel ou Cromatografia de Exclusão Molecular

A cromatografia de exclusão molecular (SEC - “*Size Exclusion Chromatography*”) permite a separação de moléculas de diferentes pesos moleculares à medida que passam por uma

matriz empacotada numa coluna constituída por esferas com tamanhos de poros definidos. Ao contrário de técnicas como cromatografia de troca iónica ou de afinidade, as moléculas não devem ficar ligadas à matriz cromatográfica, o que significa que a composição do tampão não afeta diretamente a resolução (o grau de separação entre os picos). Consequentemente, uma vantagem significativa da SEC é que as condições do tampão de eluição podem variar para se adequar ao tipo de amostra ou aos requisitos para purificação, análise ou armazenamento adicional sem alterar a separação [58].

A SEC (figura 18) é considerada uma técnica de separação altamente versátil por se poder aplicar a biomoléculas sensíveis a mudanças de pH, concentração de iões ou cofatores metálicos ou condições ambientais adversas. As separações podem ser realizadas na presença de iões essenciais, cofatores, detergentes, ureia ou cloridrato de guanidina com força iónica alta ou baixa. Além disso, a SEC pode ser realizada num grande intervalo de temperatura, cumprindo os requisitos da maioria das experiências. A SEC é normalmente aplicada com variações de temperatura entre 4 a 30 °C, mas muitas colunas SEC permitem separações em temperaturas ainda mais altas. As biomoléculas purificadas podem ser recolhidas em qualquer tampão escolhido [58].

As resinas SEC consistem numa matriz porosa de partículas esféricas química e fisicamente estáveis. Um determinado volume de matriz cromatografia é empacotada numa coluna de forma a atingir a altura de coluna necessária e é equilibrada com tampão, que preenche os poros da matriz e o espaço entre as partículas. Os componentes da amostra são eluídos isocriticamente, ou seja, a composição do tampão permanece constante durante toda a separação. Não há necessidade de usar tampões diferentes durante a separação. No entanto, uma etapa de lavagem usando o tampão de corrida é frequentemente incluída no final de uma separação para remover moléculas que possam ter sido retardadas na coluna e preparar a coluna para uma nova corrida [58].

O volume de amostra ideal a ser utilizado é cerca de 2mL (tendo sido reportado que com este volume o mcDNA é praticamente todo isolado a um caudal de 0,3 mL/min) e é introduzido diretamente no topo da coluna entrando por gravidade e evitando a diluição da amostra. O caudal deve ser baixo para dar tempo de as moléculas pequenas e médias se distribuírem e poderem entrar nos poros das esferas, enquanto as maiores passar diretamente através das esferas eluindo primeiro [63].

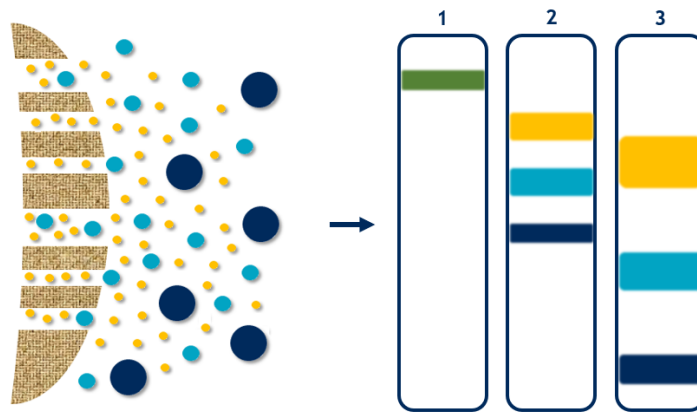


Figura 18: Representação esquemática do processo de cromatografia de exclusão molecular: (1) a amostra é aplicada à coluna; (2) a molécula de menor tamanho (amarela) é mais atrasada que a molécula de maior tamanho (azul escuro); (3) a molécula de maior tamanho é eluída primeiro da coluna. Adaptado de [58].

### 1.5.5. Purificação de mcDNA

O processo de recombinação *in vivo* na *E. coli* gera normalmente três espécies de plasmídeo representadas na figura 16, nomeadamente o mcDNA (presente em maior quantidade) o PP e o mP. Assim, o isolamento da molécula de mcDNA requer um processo de purificação posterior para separar das outras duas após o processo de indução/recombinação.

Em alguns estudos de isolamento de mcDNA, os vetores mP e PP foram linearizados e digeridos por enzimas de restrição e o mcDNA foi subseqüentemente purificado por centrifugação de gradiente de densidade de cloreto de céσιο. As maiores desvantagens deste método são o rendimento relativamente baixo de mcDNA, o elevado custo das enzimas, procedimento demoroso e as agências reguladoras não recomendarem o uso de enzimas de origem animal para a obtenção de biofármacos, tornando este processo impróprio para preparações em larga escala de mcDNA [64].

Num estudo de Chen *et al.* desenvolveram um método que degrada os restantes vetores mP e PP *in vivo* através da co-expressão de uma enzima de restrição. No entanto, com este sistema, 3% de mP e PP ainda eram detetáveis mesmo após 240 minutos de indução de recombinase e endonuclease [65].

P. Mayrhofer *et al.* descreveram um protocolo para separar mcDNA de mP no qual o “backbone” do PP foi modificado para que o vetor de mcDNA resultante contenha uma sequência do operador da lactose, a qual posteriormente é reconhecida por uma coluna cromatográfica portadora da proteína repressora do operador da lactose como ligando. Assim, na ausência de lactose o operador existente no vetor de mcDNA vai interagir com o repressor da coluna ficando retido. Esta técnica apresenta a vantagem de ser relativamente rápida, uma vez que uma corrida na coluna dura cerca de 50 min, no entanto é uma técnica

dispendiosa devido ao elevado custo da coluna cromatográfica (sendo necessário produzir e purificar o ligando - proteína recombinante repressora do operão da lactose), assim como a necessidade de modificar o “*backbone*” do PP, o que impede a aplicação desta metodologia de purificação a qualquer vetor de PP. Outra desvantagem é que esta técnica não consegue separar as moléculas de PP que não tenham sido convertidas no processo de recombinação [56].

Posteriormente, XH Hou *et al.* publicaram um estudo semelhante referente à purificação de mcDNA usando sequências de reconhecimento específicas, no qual o “*backbone*” do PP também foi modificado. No entanto, nesse estudo, as sequências foram inseridas na região correspondente ao mP, o qual, na presença de oligonucleótidos de DNA biotilado, levando à formação de uma estrutura de tripla hélice reversível. Estas moléculas indesejadas foram então removidas por contas magnéticas revestidas com streptavidina, resultando no isolamento de mcDNA numa coluna comercial de cromatografia de troca aniónica com 94-95% de recuperação. Esta técnica permite separar o mcDNA do PP e do mP e não é muito demorada, uma vez que o tempo de incubação das contas magnéticas para o isolamento de mcDNA é de apenas 2h. Contudo, esta técnica apresenta elevados custos associados à modificação do “*backbone*” do PP e à utilização das contas magnéticas revestidas com streptavidina [66].

Num outro estudo de C.P.A. Alves *et al.* foi estabelecida uma estratégia de purificação para o mcDNA ao recorrer à digestão enzimática *in vitro* das moléculas de mP e PP usando uma endonuclease “*nicking*” (enzima que corta o DNA de cadeia dupla no sítio de restrição), para facilitar a separação do mcDNA do PP e mP que se tornaram moléculas lineares. Posto isto, foi conseguido o isolamento de mcDNA usando cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Embora esta técnica providencie bons resultados para isolar mcDNA, requer o uso de moléculas de PP modificadas com sequências específicas, pelo que não poderá ser usada noutras moléculas de PP disponíveis no mercado. Além do mais, algumas destas estratégias não apresentam seletividade suficiente para permitir o isolamento da isoforma superenrolada (sc - “*supercoiled*”) de mcDNA de outras isoformas e o uso de elevadas concentrações de sal para a HIC requer um custo adicional. Considerando todos estes aspetos, a produção em larga escala seria demasiado dispendiosa para permitir ao mcDNA terapêutico ser facilmente acessível [67].

Para ultrapassar estes obstáculos, T. Diamantino *et al.* publicaram uma estratégia cromatográfica de troca aniónica fraca na qual a purificação de mcDNA sc foi alcançada com sucesso usando um monolito comercial CIM DEAE-1. Esta é uma técnica rápida (30 min) e de custo relativamente reduzido. No entanto, este método também apresentou as suas limitações, tendo em conta que apenas 50% do conteúdo de mcDNA sc foi recuperado. Na verdade, a falta de seletividade pode estar relacionada com o facto de que ligandos de troca aniónica fraca apenas estabilizam interações iónicas com a molécula alvo, pelo que, na

presença de outras moléculas com carga superficial semelhante, a seletividade destas matrizes cromatográficas pode decrescer significativamente [68].

Mais recentemente A.M. Almeida, *et al.* descreveram um método de purificação de mcDNA sc usando pela primeira vez ligandos de lisina e o seu derivado descarboxilado, cadaverina. Tais ligandos são normalmente manipulados para explorar interações eletrostáticas. Contudo, estas moléculas são conhecidas por estabelecerem outro tipo de interações elementares, tais como ligações de hidrogénio, ligações mediadas pela água, interações hidrofóbicas ou forças de van der Waals, que podem finalmente contribuir para maior seletividade relativamente à molécula-alvo, comparativamente com trocadores aniónicos fracos disponíveis comercialmente. À primeira vista, o monolito de lisina mostrou ser capaz de isolar mcDNA sc, embora resultando numa baixa recuperação do mesmo. A tentativa de aumentar o rendimento de recuperação resultou numa perda de pureza, sugerindo assim baixa seletividade associada ao ligando de lisina para o mcDNA. Por outro lado, o monolito modificado de cadaverina também foi capaz de separar o mcDNA sc apresentando melhor rendimento de recuperação (78.6%) do que a coluna de lisina, sem perda de pureza (98.4%). No geral, este método apresenta uma estratégia de purificação de mcDNA sc a custo reduzido, mais simples e prática comparativamente a outros estudos anteriores [69].

## **Capítulo 2 - Objetivos Globais**



O vírus do papiloma humano (HPV) infecta um grande número de pessoas em todo o mundo e está associado a mais de 99% do cancro do colo do útero, sendo a quarta maior causa de morte por cancro em mulheres. As proteínas E6 e E7 do vírus são responsáveis pela transformação das células infetadas e progressão do tumor, devido à degradação e inativação dos supressores de tumor p53 e pRB, respetivamente. Desta forma, a aplicação de um biofármaco que simultaneamente silencie a expressão das oncoproteínas E6 e E7 e restabeleça os níveis de p53 pode ser uma potencial vertente de terapia génica para o tratamento do cancro do colo do útero. Neste contexto, o vetor de mcDNA torna-se promissor por não conter genes bacterianos e favorecer a expressão dos genes alvo por aumento da eficiência de transfeção e permanência nas células, em comparação com o vetor de DNA plasmídico, por exemplo.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo a produção e purificação de quatro vetores de mcDNA: o mcDNA vazio (mcDNA-vazio [3,8 Kpb]), o mcDNA que codifica o gene supressor de tumor p53 (mcDNA-p53 [5,0 Kpb]), o mcDNA que codifica o primiR-375 (mcDNA-primiR-375 [4,5 Kpb]) e o mcDNA que codifica ambos os genes (mcDNA-conjugado [5,7 Kpb]), usando metodologias já descritas, para avaliar o efeito isolado de cada gene e o efeito do vetor multigénico, em comparação com o vetor vazio, por estudos de transfeção *in vitro* de células cancerígenas do colo do útero.

A ordem de trabalhos será a seguinte:

- ➔ Obtenção dos quatro vetores de DNA minicircular (mcDNA) por recombinação do plasmídeo parental na presença do indutor L-arabinose, em *E. coli*, extração e purificação.
- ➔ Avaliação da eficiência de transfeção celular com os vetores de mcDNA mono e multigénicos, estudo da expressão de p53, E6 e E7, avaliação da apoptose e comparação do efeito isolado e combinado dos genes contidos nos vetores de mcDNA, usando um modelo celular *in vitro* do cancro do colo do útero.



## **Capítulo 3 - Materiais e Métodos**



## 3.1. Produção

### 3.1.1. Fermentação

Os respectivos PPs foram amplificados através de fermentação da *E. coli* ZYCY10P3S2T. A fermentação foi realizada durante aproximadamente 7 a 8 horas num agitador orbital programado para 42°C e 250 rpm. Foi usado o meio “Terrific Broth” (TB) (composto por 20 g/L de Triptona, 24 g/L de Extrato de Levedura, 4 mL/L de Glicerol, 0,017M de  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ , 0,072M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 50 mg/mL de antibiótico kanamicina) para crescer as bactérias até atingir uma densidade ótica (DO) entre 4 e 5 (figura 19).

### 3.1.2. Indução

Após obtenção da DO pretendida, os meios foram adicionados à mistura de indução (meio LB com 0,01% de indutor L-arabinose estéril e 0,04 M de NaOH) e foram deixados a induzir durante 3 horas a 32 °C e 250 rpm. Por fim, as células foram recuperadas por centrifugação a 4500 rpm a 4°C durante 10 min, descartando-se o sobrenadante e armazenando os pellets a -20°C (figura 19).

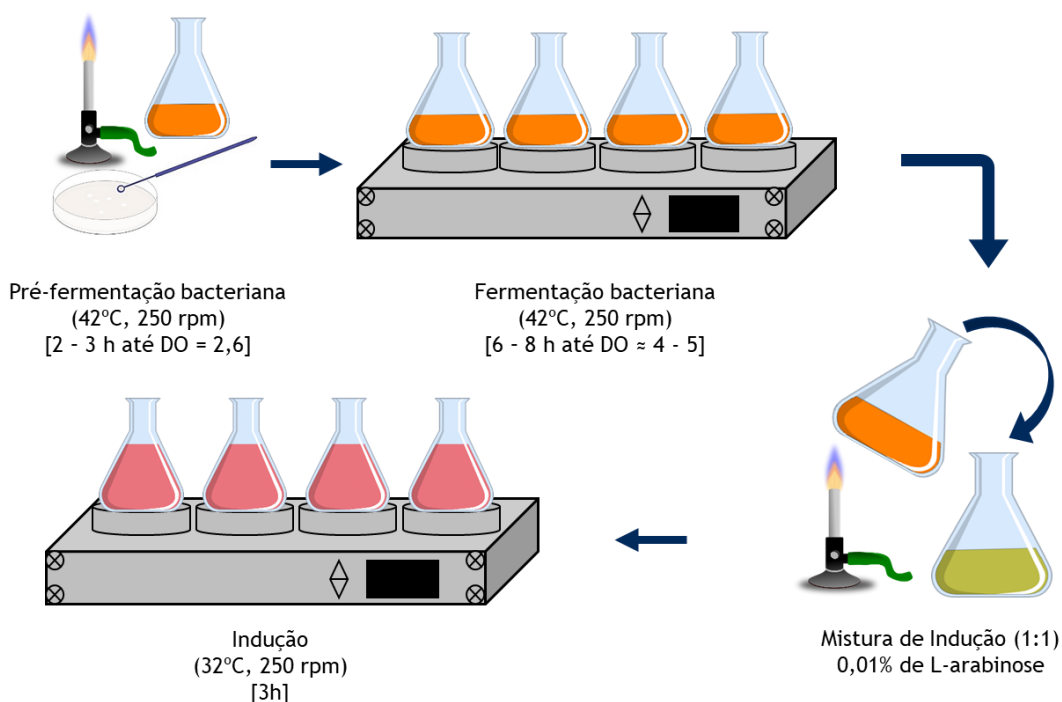


Figura 19: Representação esquemática do processo de produção de mcdNA. Adaptado de [57].

## 3.2. Extração

### 3.2.1. Extração de mcDNA recorrendo ao Kit Qiagen

#### 3.2.1.1. *Extração de mcDNA recorrendo ao Kit Qiagen de acordo com as instruções do fabricante*

Numa primeira fase, após descongelamento do pellet, adicionou-se 20 mL de solução I/P1 (50 mM de Tris-HCl, a pH 8,0; 10 mM de EDTA; 100 µg/mL RNase A) e agitou-se vigorosamente para ressuspender as células. De seguida, adicionou-se 20 mL de solução II/P2 (200 mM NaOH; 1% SDS (m/v)) para realizar a lise alcalina, homogeneizando cuidadosamente e incubando durante 5 minutos à temperatura ambiente. Depois, adicionou-se 20 mL de solução III/P3 (3 M de acetato de potássio, a pH 5,5) para neutralizar a base e precipitar os restos celulares e moléculas degradadas, homogeneizando e incubando durante 20 minutos no gelo e por fim centrifugou-se duas vezes a 20000 g durante 35 minutos.

Duas colunas de bancada de troca aniónica provenientes do kit foram equilibradas com 10 mL de solução de equilíbrio/QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 0,15% Triton X-100, 15% Isopropanol, pH 7,0) e adicionou-se o sobrenadante obtido da última centrifugação. Após entrada total da amostra por gravidade nas colunas, adicionou-se por duas vezes 30 mL de solução de lavagem/QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Isopropanol, pH 7,0). De seguida, recuperou-se o mDNA com 15 mL de solução de eluição/QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris, 15% Isopropanol, pH 8,5), adicionou-se 10,5 mL de isopropanol para precipitar DNA e centrifugou-se durante 30 minutos a 15000g. Por fim, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 10 mM Tris-EDTA.

#### 3.2.1.2. *Extração de mcDNA recorrendo ao Kit Qiagen adaptado*

No primeiro passo realiza-se a lise alcalina com os tampões P1, P2 e P3 como descrito no primeiro parágrafo do ponto 3.2.1.1.

Na fase seguinte, regeneraram-se as colunas com a solução de regeneração (3 M NaCl, 0,15% Triton X-100), depois realizam-se os mesmos passos descritos no segundo parágrafo do ponto 3.2.1.1. com a alteração da concentração de sal para a solução de lavagem (750 mM NaCl) e para a solução de eluição (1,75 mM NaCl).

### 3.2.2. Extração Modificada de Amostra Complexa

Após descongelamento do pellet, adicionou-se 20 mL de solução A (50 mM glucose; 25 mM de Tris-HCl; 10 mM de EDTA, a pH 8,0) e agitou-se vigorosamente no vórtex, depois dividiu-se o conteúdo por 2 tubos de centrifuga e adicionou-se 10 mL de solução B (200 mM NaOH; 1% SDS (m/v)) a cada um, homogeneizando cuidadosamente e incubando durante 5 minutos à temperatura ambiente, de seguida adicionou-se 10 mL de solução C (3,0 M de acetato de potássio, a pH 5,0), homogeneizou-se e incubou-se durante 20 minutos no gelo, a seguir centrifugou-se durante 30 minutos a 20000 g e a 4 °C, duas vezes, descartando-se o pellet, mediu-se o volume de sobrenadante e adicionou-se 0,7 volumes de isopropanol, homogeneizando suavemente e incubando 30 minutos no gelo para precipitar o DNA, depois centrifugou-se a 16000g durante 30 minutos a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 1 mL de 10 mM de Tris-HCl, a pH 8,0, de seguida adicionou-se sulfato de amónio até se obter uma concentração final de 2,5 M (para 2 mL adicionar 0,66 g), agitou-se suavemente em círculos e incubou-se 15 minutos no gelo, por fim centrifugou-se a 16000g durante 20 minutos a 4 °C (precipitação de proteínas e RNA) e recuperou-se o sobrenadante, sendo armazenado em microtubos a -80 °C.

## 3.3. Purificação

### 3.3.1. Cromatografia de Filtração em Gel ou Exclusão Molecular

Após a extração modificada de amostra complexa, descrita no ponto 3.2.2., foi necessária uma purificação adicional no equipamento ÄKTA Pure, numa coluna de filtração em gel Sephacryl S-1000 SF (*GE Healthcare Biosciences, Suécia*) (volume de coluna = 106 mL), equilibrada com solução tampão 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl (pH 7,0). Após injeção da amostra de lisado, o ensaio foi realizado aplicando um gradiente isocrático com um caudal de 0,3 mL/min, à temperatura ambiente e a absorvância foi monitorizada ao longo do tempo a 260 nm.

#### 3.3.1.1. Coluna de 60 cm

Foram injetados na coluna de 60 cm (106 mL de volume) 2 mL de amostra de lisado proveniente da extração modificada e foram recolhidas frações de 3 mL correspondentes ao pico de mcDNA de interesse. Estes 3 mL de cada fração recolhida foram posteriormente dessalinizados e concentrados para 200 µL em concentradores Vivaspin®.

### 3.3.1.2. Coluna de 90 cm

Foram injetados na coluna de 90 cm (180 mL de volume) 2 mL de amostra de lisado proveniente da extração modificada e foram recolhidas frações de 3 mL correspondentes ao pico de mcDNA de interesse. Estes 3 mL de cada fração recolhida foram posteriormente dessalinizados e concentrados para 200 µL em concentradores Vivaspin®.

### 3.3.2. Eletroforese

O gel usado na eletroforese foi preparado para 40 mL de tampão TAE 1x (40 mM de base Tris, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA a pH 8,0), 0,4 g de agarose e 0,6 µL de *Greensafe*. Foram depositados nos poços 20 µL de amostra diluída numa proporção de 1:5 com 2 µL de *Loading Buffer* adicionais (0,2 g de Azul de Bromofenol, 6 mL de Glicerol 50% e 4 mL de água MiliQ).

## 3.4. Estudos *in vitro*

As células CaSki (células metastáticas provenientes de carcinoma epidermoide cervical, HPV-16) foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e os Fibroblastos humanos (FibH) foram cultivados em meio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium /Ham's F-12 Nutrient Mixture). Estes meios de cultura (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) foram suplementados com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e com 1% (v/v) de uma mistura de antibióticos constituída por penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) designando-se de meio completo. O crescimento das células foi promovido a uma temperatura de 37 °C, em atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar.

### 3.4.1. Transfeção

Os estudos *in vitro* tiveram como objetivo comparar a eficiência de transfeção entre os vetores mcDNA-p53, mcDNA-vazio, mcDNA-primiR-375 e mcDNA-p53+primiR-375, assim como avaliar o efeito terapêutico do gene ou genes codificados nestes vetores. Para isto, foi utilizado o regente de transfeção Torpedo<sup>DNA</sup> (ibidi GmbH, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram mantidas em cultura até atingirem uma confluência de cerca de 50%-60%, sendo semeadas em placas com uma densidade de  $6,2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em meio completo. Após 24 horas, foi realizada a substituição deste meio completo para meio incompleto (sem antibiótico). No dia seguinte, o reagente de transfeção foi incubado com os vetores mcDNA-vazio, mcDNA-p53, mcDNA-primiR-375 e mcDNA-conjugado durante 20 minutos à temperatura ambiente, de modo a permitir a formação de complexos entre os lípidos catiónicos e o DNA plasmídico, sendo que o rácio DNA plasmídico (µg) : TorpedoDNA (µL) utilizado foi de 1:3. As misturas reacionais foram adicionadas aos respetivos poços e as

células transfetadas foram novamente incubadas com as mesmas condições de cultura. Após 6 horas do início da transfeção, o meio incompleto foi substituído por meio completo (figura 20).

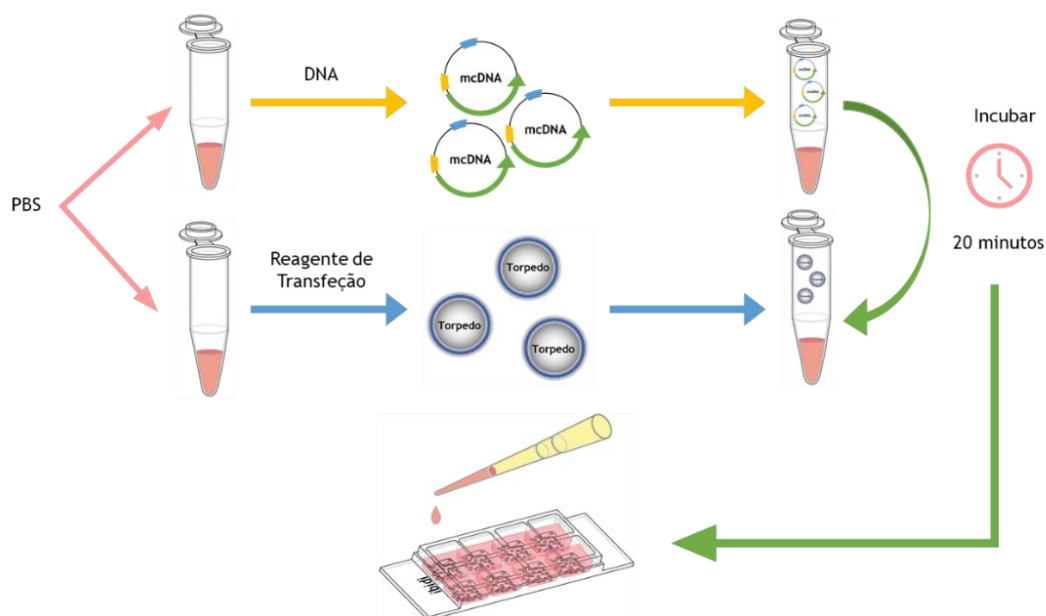


Figura 20: Representação esquemática do procedimento de transfeção *in vitro*. Adaptado de [70].

### 3.4.2. Ensaio de Viabilidade Celular

Para o ensaio de viabilidade celular foram utilizados FibH e semeados com uma densidade de  $10^4$  células/poço em placas de 96 poços. As transfecções foram realizadas às 24, 36, 48 e 72 horas com os vetores, mcDNA-vazio, mcDNA-p53, mcDNA-primiR-375 e mcDNA-conjugado. 2 horas antes do final de cada tempo de transfeção, descartou-se o meio de cultura e adicionou-se a cada poço 100  $\mu$ L de meio completo e 20  $\mu$ L de resazurina e incubaram-se as células durante 4 horas no escuro nas condições normais de cultura. Após as 4 horas de incubação, transferiu-se a mistura de cada poço para uma placa de fundo opaco e procedeu-se à leitura da fluorescência num espectrofluorímetro. A análise estatística dos resultados foi feita com o ensaio Two-way ANOVA no software GraphPad Prism (versão 6.01).

### 3.4.3. Ensaio de Proliferação Celular

Para o ensaio de avaliação da proliferação celular foram semeadas células CaSki com uma densidade de  $2,97 \times 10^4$  células/poço em placas de 24 poços. Avaliou-se a contagem de células às 0 horas e as transfecções foram realizadas às 24, 36, 48 e 72 horas com os vetores mcDNA-vazio, mcDNA-p53, mcDNA-primiR-375 e mcDNA-conjugado. Parou-se a transfeção com tripsina após remoção do meio e as células foram recuperadas por centrifugação com o número de células viáveis determinado por coloração com azul de tripano. Foi utilizado um

controlo de células não-transfetadas. A análise estatística dos resultados foi feita com o ensaio Two-way ANOVA no software GraphPad Prism (versão 6.01).

### 3.4.4. Extração de RNA

Para a extração de RNA de células CaSki, estas foram semeadas com uma densidade celular de  $2,4 \times 10^5$  células/poço em placas de 12 poços. As transfecções foram realizadas às 24, 36 e 48 horas com os vetores mcDNA-p53, mcDNA-primiR-375 e mcDNA-conjugado. Após o processo de transfecção, as células controlo e transfetadas foram submetidas à extração de RNA. Para isto, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de reagente TRIzol® (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) em cada poço, de modo a provocar a lise das células, incubando-se durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de clorofórmio para permitir a separação das diversas biomoléculas em diferentes fases, incubando-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se então à centrifugação das amostras a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C, permitindo a separação de uma fase aquosa superior que contém o RNA, uma interfase e uma fase orgânica inferior que contém DNA e proteínas. A fase aquosa foi recuperada muito cuidadosamente e foram adicionados 125  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado, de modo a permitir a precipitação do RNA, incubando-se durante 10 minutos no gelo. As amostras foram novamente centrifugadas a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C, e foi realizada a lavagem do pellet com 125  $\mu\text{L}$  de etanol 75% para eliminar compostos orgânicos. Foi realizada uma nova centrifugação a 12000 g durante 5 minutos a 4 °C, rejeitando o sobrenadante e ressuspensando o pellet de RNA em 20  $\mu\text{L}$  de água dietil-pirocarbonato (DEPC). Para confirmar o sucesso da extração de RNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% e a quantificação das amostras foi realizada num nanofotómetro (Implen GmbH, Alemanha) (figura 21).

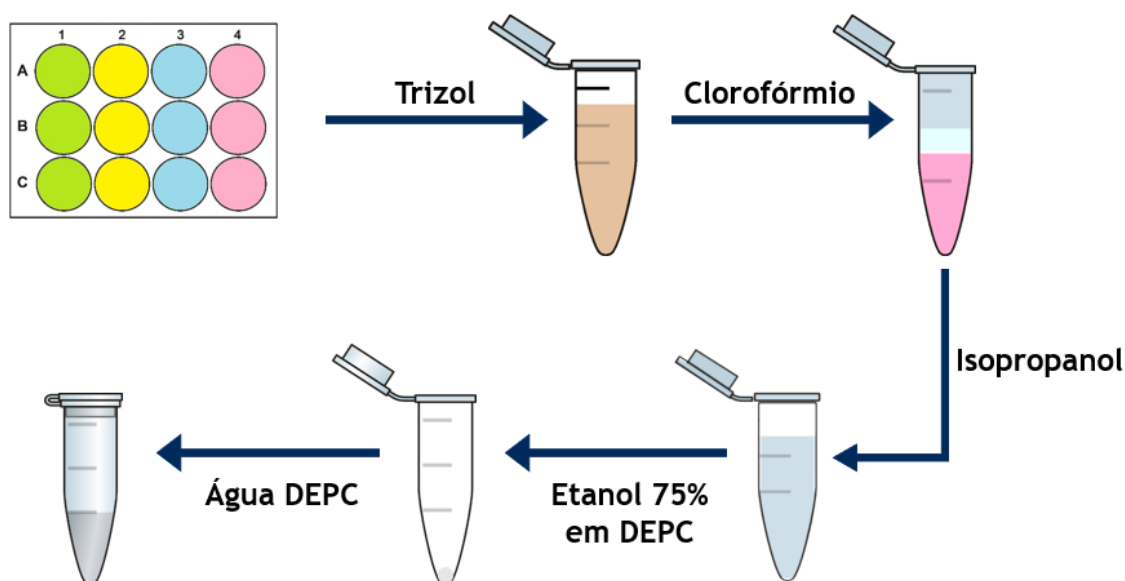


Figura 21: Representação esquemática do protocolo de extração de RNA.

### 3.4.5. Síntese de cDNA

Foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir das amostras de RNA extraído anteriormente, utilizando o kit *Xpert cDNA Synthesis* (GRiSP - Research Solutions, Portugal). De acordo com as instruções do fabricante, em cada tubo de PCR foi adicionado 1 µg de RNA total, 1 µL de *Random Primers* e 1 µL de dNTP's, adicionando água livre de RNases para perfazer um volume final de 14,5 µL. As amostras foram incubadas durante 5 minutos a 65 °C, seguindo-se uma incubação durante 2 minutos no gelo. Posteriormente, foram adicionados 4 µL de solução-tampão, 0,5 µL de *RNase Inhibitor* e 1 µL de *Xpert RTase*, por esta mesma ordem. Por último, a mistura reacional foi incubada durante 10 minutos a 25 °C, seguindo-se uma incubação durante 50 minutos, a 50 °C e, por último, uma incubação durante 5 minutos a 85 °C.

### 3.4.6. RT-PCR

A técnica de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) foi realizada com o objetivo de analisar os níveis de transcritos. A mix para uma reação foi preparada na seguinte ordem: 8,55 µL H<sub>2</sub>O estéril, 0,6 µL primer FW, 0,6 µL primer RV, 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µL de dNTPs, 1,25 µL PCR *Buffer*, 0,25 µL Taq e 0,30 µL de cDNA, resultando num volume de 12,5 µL por reação. As misturas reacionais foram colocadas num termociclador T100 (BioRad, Estados Unidos da América), programado com a seguinte sequência de incubações: 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a Ta (Temperatura de *annealing* - correspondente à menor Tm [Temperatura de *melting*] de cada par de primers) e 1 minuto a 72 °C, e por último, 10 minutos a 72 °C. Ao todo foram utilizados três pares de *primers* desenhados especificamente para o transcrito do gene p53 (FW: 5'- CCT CAC CAT CAT CAC ACT GG -3'; RV: 5'- CCT CAT TCA GCT CTC GGA AC -3'), do gene E6 (FW: 5'- CAG GAG CGA CCC AGA AAG TT -3'; RV: 5'- GTC ATA TAC CTC ACG TCG CAG T -3') e do gene E7 (FW: 5'- TCC AGC TGG ACA AGC AGA ACC GGA -3'; RV: 5'- GCA CAC AAT TCC TAG TGT GCC CAT -3'). Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%.

### 3.4.7. RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR (*Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) foi realizada com o objetivo de analisar quantitativamente os níveis de transcritos por sendo uma técnica mais sensível. A mix para uma reação foi preparada na seguinte ordem: 10 µL de *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix*, 1,2 µL primer FW, 1,2 µL primer RV, 6,6 µL de H<sub>2</sub>O estéril e 1 µL de cDNA, resultando num volume de 20 µL por reação. As misturas reacionais foram colocadas num sistema de *Real-Time CFX Connect™* (BioRad, Estados Unidos da América), programado com a seguinte sequência de incubações: 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 1 minuto a 72 °C, e por último, 10 minutos a 72

°C. Ao todo foram utilizados os três pares de *primers* desenhados especificamente para o transcrito do gene p53, do gene E6 e do gene E7 que foram usados em RT-PCR e um par de *primers* adicional do transcrito do gene *housekeeping* Gapdh (FW: 5'- ATG GGG AAG GTG AAG GTC G -3'; RV: 5'- GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A -3'). A análise estatística dos resultados foi feita com o ensaio *Ordinary one-way ANOVA* no software *GraphPad Prism* (versão 6.01).

#### 3.4.7.1. Eficiência de *primers*

Para estudar a eficiência dos *primers* de GAPDH, E6 e E7 foi utilizada uma linearidade de 1:1, 1:2, 1:20, 1:200, 1:2000, 1:20000 em que a amostra inicial correspondeu ao controlo de células não transfectadas (figuras 22, 24 e 25). Para a eficiência dos *primers* de p53 foi utilizada a mesma linearidade mas a amostra inicial correspondeu a uma amostra de células 24 h após serem transfectadas com o vetor mcDNA-p53 (figura 23). As amostras foram corridas no programa de *real-time* referido no ponto 3.4.7. e os resultados foram analisados na folha de cálculo Excel.

Para confirmar que a técnica foi realizada nas melhores condições, realizou-se a eficiência de *primers* que confirmou que todos eles estavam nas melhores condições, tal como podemos verificar pelos gráficos representados nas figuras 22, 23, 24 e 25.

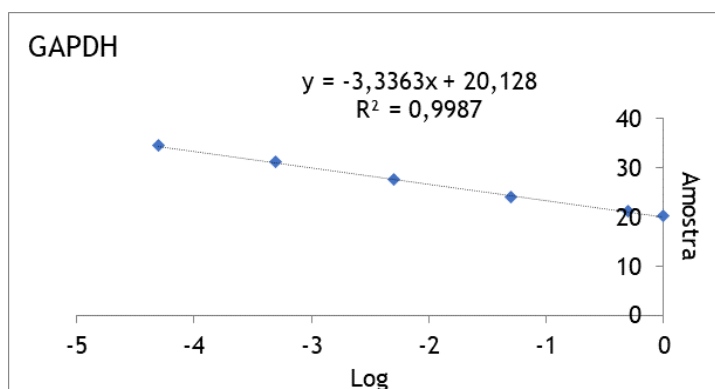


Figura 22: Representação gráfica da eficiência de *primers* para o transcrito do gene *housekeeping* Gapdh com uma eficiência de 99,70%.

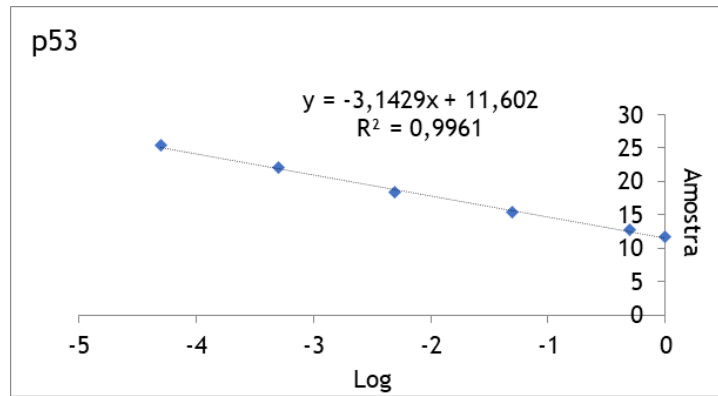


Figura 23: Representação gráfica da eficiência de *primers* para o transcrito do gene p53 com uma eficiência de 104,03%.

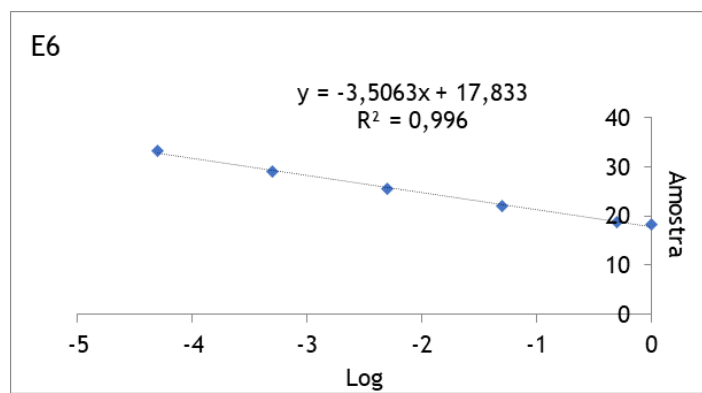


Figura 24: Representação gráfica da eficiência de *primers* para o transcrito do gene E6 com uma eficiência de 96,42%.

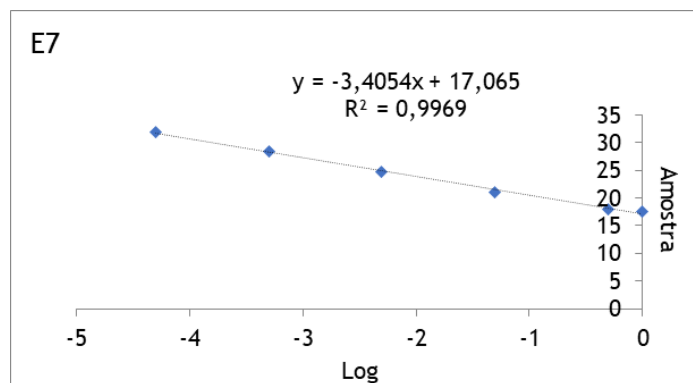


Figura 25: Representação gráfica da eficiência de *primers* para o transcrito do gene E7 com uma eficiência de 98,32%.



## **Capítulo 4 - Resultados e Discussão**



## 4.1. Produção

Para melhor compreender o comportamento de cada um dos vetores no processo de fermentação foi feita uma curva de crescimento para cada um, como demonstrado na figura 26. De acordo com os resultados obtidos, é possível verificar que os vetores apresentam um crescimento muito semelhante entre si, sendo que, por volta das 7 horas de fermentação estão todos em condições de iniciar o processo de indução. Estes resultados também sugerem que a diferença de tamanhos dos vetores de PP estudados não parece afetar significativamente o processo de fermentação do sistema hospedeiro usado (*E. coli* ZYCY10P3S2T).

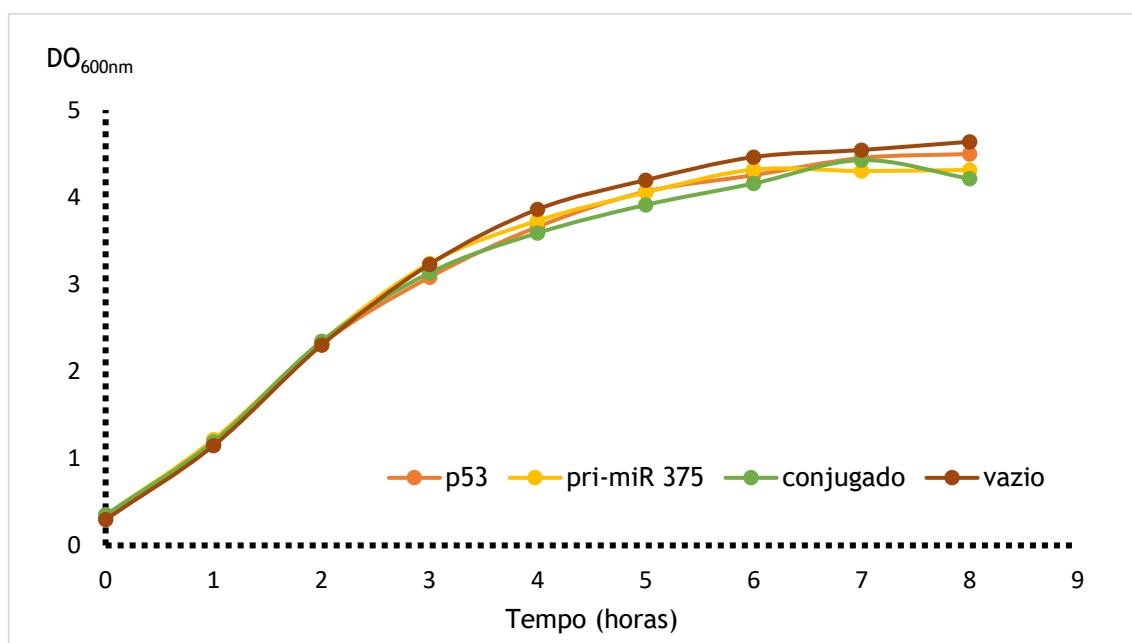


Figura 26: Representação gráfica da curva de crescimento para cada um dos vetores.

## 4.2. Extração

### 4.2.1. Extração por Kit Qiagen

#### 4.2.1.1. Kit de acordo com as instruções do fabricante

A primeira abordagem realizada para extrair e purificar a amostra de mcDNA, passou pela utilização de um kit comercial utilizado para purificar pDNA (Plasmid Purification DNA Kit, QIAGEN), no sentido de avaliar se seria uma forma viável de obter boas quantidades de mcDNA livre de impurezas do hospedeiro e prosseguir para estudos de transfeção *in vitro*. Este kit foi então testado para a obtenção de dois dos quatro vetores: o mcDNA-pri-miR-375 [4,5 kpb] e o mcDNA-conjugado [5,7 kpb] e os resultados estão apresentados na figura 27.

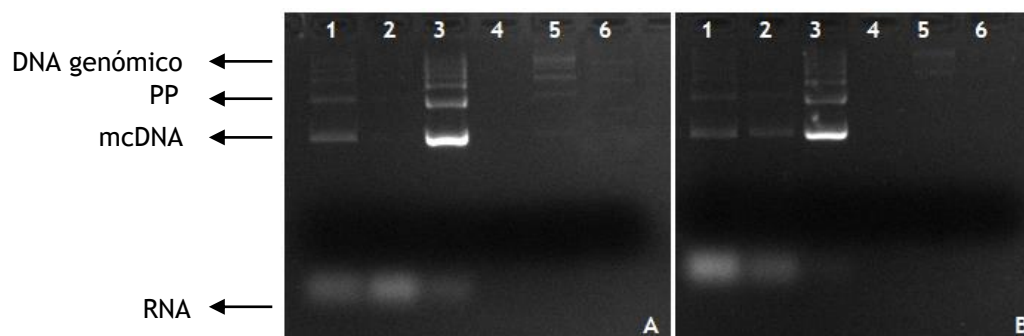


Figura 27: Eletroforese proveniente da extração com o kit de acordo com as instruções do fabricante. A - mcDNA-conjugado; B - mcDNA-primiR-375; 1 - Lisado; 2 - Sobrenadante; 3 - Solução lavagem I; 4 - Solução lavagem II; 5 - Solução eluição; 6 - Amostra final.

Como se pode verificar pela figura 27, a aplicação deste kit mostra uma ligeira perda de mcDNA logo no passo de ligação (coluna 2 da figura 27 A e B) e apresenta grandes perdas de mcDNA no primeiro passo de lavagem (coluna 3 da figura 27 A e B), obtendo-se assim concentrações muito reduzidas no fim de todo o processo (mcDNA-conjugado = 12 µg de mcDNA; mcDNA-primiR-375 = 4,5 µg de mcDNA). Possivelmente, as condições de força iónica do tampão de lavagem (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% isopropanol, pH 7,0) não são adequadas para manter o mcDNA ligado à matriz de carga positiva e limpar somente as impurezas da amostra, resultando assim numa eluição praticamente total de todos os ácidos nucleicos presentes na amostra de lisado.

#### 4.2.1.2. Kit adaptado

Uma vez que seguindo as instruções do fabricante se obtiveram concentrações de mcDNA muito baixas devido a perdas no processo de ligação e lavagem, procedeu-se à otimização de alguns dos tampões de forma a tentar obter melhores rendimentos de recuperação de mcDNA. Assim, reduziu-se a concentração do sal cloreto de sódio na solução de equilíbrio das colunas e na solução de lavagem de forma a permitir uma maior interação do mcDNA com a coluna e aumentou-se a concentração deste mesmo sal na solução de eluição de forma a promover mais facilmente a eluição das moléculas de interesse. Os resultados obtidos estão representados na figura 28.

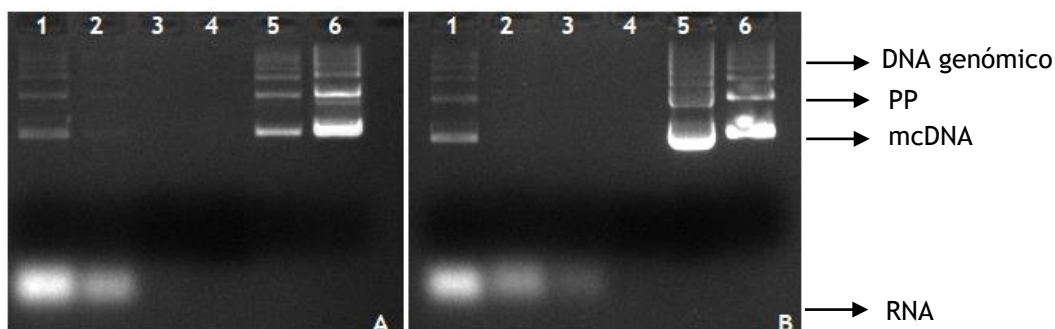


Figura 28: Eletroforese proveniente da extração com o kit adaptado. A - Vetor Conjugado = 72,5 µg de mcDNA; B - Vetor primiR-375 = 58 µg de mcDNA; 1 - Lisado; 2 - Sobrenadante; 3 - Solução lavagem I; 4 - Solução lavagem II; 5 - Solução eluição; 6 - Amostra final.

Os resultados mostram que já não ocorre perda do mcDNA nos passos de ligação e lavagem, obtendo-se assim concentrações mais elevadas no fim de todo o processo, no entanto também se verificou que a amostra final de mcDNA contém uma contaminação considerável de PP e algum DNA genómico (gDNA). Tendo em conta que o principal objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência de transfeção celular de vetores de mcDNA mono e multigénicos, surge a necessidade de procurar uma forma de purificar as amostras de mcDNA. Além disso, a aplicação de enzimas de origem animal na preparação de biofármacos não é recomendada pelas agências reguladoras devido à possibilidade de induzir efeitos adversos no paciente [71]. Assim, foi explorada uma estratégia alternativa consistindo na extração modificada para a obtenção de lisado clarificado de mcDNA seguida de purificação por cromatografia de exclusão molecular para perceber se efetivamente se conseguiam obter boas concentrações de mcDNA puro.

#### 4.2.2. Extração Modificada de Amostra Complexa

Esta estratégia de extração tem por objetivo lisar as células hospedeiras e aplicar um processo de pré-tratamento à amostra de lisado para posteriormente realizar uma purificação por cromatografia de exclusão molecular. Além desta estratégia não conter soluções com RNases, consiste na aplicação de elementos que ajudam a pré-clarificar a amostra, nomeadamente a precipitação de ácidos nucleicos com isopropanol vai permitir concentrar a amostra e a precipitação de RNA de elevado peso molecular e proteínas com sulfato de amónio vai ajudar a obter uma amostra clarificada [72]. Na figura 29 está representada a eletroforese das amostras de lisado obtidas dos vetores de mcDNA-primiR-375, mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado. Estes resultados mostram que apesar de ter havido uma redução significativa do conteúdo de RNA e a banda de mcDNA ser mais intensa que as de plasmídeo parental e DNA genómico, ainda se encontra muito contaminada por estas moléculas, o que reforça a necessidade de proceder para a uma purificação.

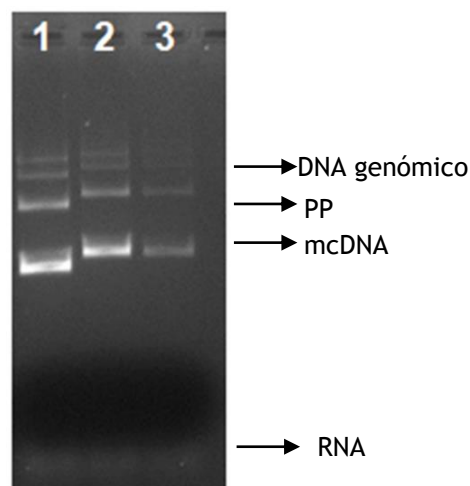


Figura 29: Eletroforese de amostras de mcDNA-primiR-375, mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado obtidas com a extração modificada. 1 - [mcDNA-primiR-375] = 234  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 2 - [mcDNA-p53] = 230  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 3 - [mcDNA-primiR-375+p53] = 203  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## 4.3. Purificação

### 4.3.1. Cromatografia de Filtração em Gel

As amostras obtidas na etapa de extração modificada, foram injetadas numa coluna de Sephacryl S-1000 SF de 60 cm ou 90 cm, para a realização da cromatografia de filtração em gel ou de exclusão molecular. Esta estratégia de purificação baseia-se na separação das moléculas com base nos pesos moleculares, ou seja, são primeiro eluídas as moléculas de maior peso molecular e por fim as de menor peso molecular que vão sendo retardadas nos poros das esferas de sefarose [58]. Assim, espera-se que a ordem de eluição seja primeiro o gDNA, seguido de PP, posteriormente o mcDNA e por fim o RNA.

Neste trabalho, para a correta separação das moléculas de mcDNA e respetivo PP foi usada uma matriz de Sephacryl S-1000 SF com um intervalo de fracionamento de  $5 \times 10^5$  a  $10^8$  pesos moleculares a um fluxo de 0,3 mL/min previamente otimizado por A.M. Almeida e co-autores para a separação de mcDNA e PP [63]. Assim, essa matriz será explorada no presente trabalho para a separação de diferentes pares de mcDNA e PP contendo diferentes genes que fazem variar o tamanho final destas moléculas.

#### 4.3.1.1. Coluna de 60 cm

Inicialmente foi preparada uma coluna de Sephacryl S-1000 SF de 60 cm de altura para se explorar a sua eficiência e as condições mais adequadas para a separação dos ácidos nucleicos de diferentes tamanhos presentes no lisado de mcDNA-primiR-375 [4,5 Kpb].

Sabe-se que em SEC, a taxa de fluxo é inversamente proporcional à resolução dos picos. Este fenómeno deve-se ao facto de que, em elevadas taxas de fluxo, as moléculas tendem a perder a capacidade de difusão dentro e fora dos poros da matriz. Assim, aplicando um fluxo de 0,3 mL/min A.M. Almeida e co-autores demonstraram que o mcDNA é quase totalmente isolado com um volume de amostra de 2 mL determinando os níveis de recuperação ( $66\% \pm 4,37\%$ ) e pureza ( $98,35\% \pm 1,56\%$ ) do mcDNA em comparação com outros contaminantes (PP e mP) [61]. Assim, estas foram as condições utilizadas para a realização dos primeiros ensaios deste trabalho.

Após a saída do tampão correspondente ao volume morto da coluna, foram recolhidas frações de 3 mL ao longo do ensaio, para serem posteriormente concentradas e analisadas por eletroforese de agarose. Como se pode verificar na figura 31, fez-se uma recolha de várias frações antes e depois do pico de mcDNA para se verificar quais as frações mais adequadas a recolher de forma a obter uma boa quantidade/massa de mcDNA evitando contaminação com outros ácidos nucleicos.

Primeiramente, neste tipo de cromatograma, e tomando o exemplo da figura 30, eluíram as moléculas de maior tamanho, neste caso o gDNA e o PP que não foi corretamente induzido em mcDNA, correspondente às frações 2 a 7 da eletroforese da figura 31. De seguida eluiu a molécula de interesse, o mcDNA, pois possui um tamanho intermédio entre o PP e o RNA, o que corresponde às frações 8 a 15 da eletroforese que serão as frações de interesse uma vez que se encontram pouco ou nada contaminadas por PP ou RNA. Por fim, elui o RNA, que é a molécula mais pequena que vai sendo retardada nos poros da matriz cromatográfica, saindo por último, correspondendo às frações 16 a 20 da eletroforese.

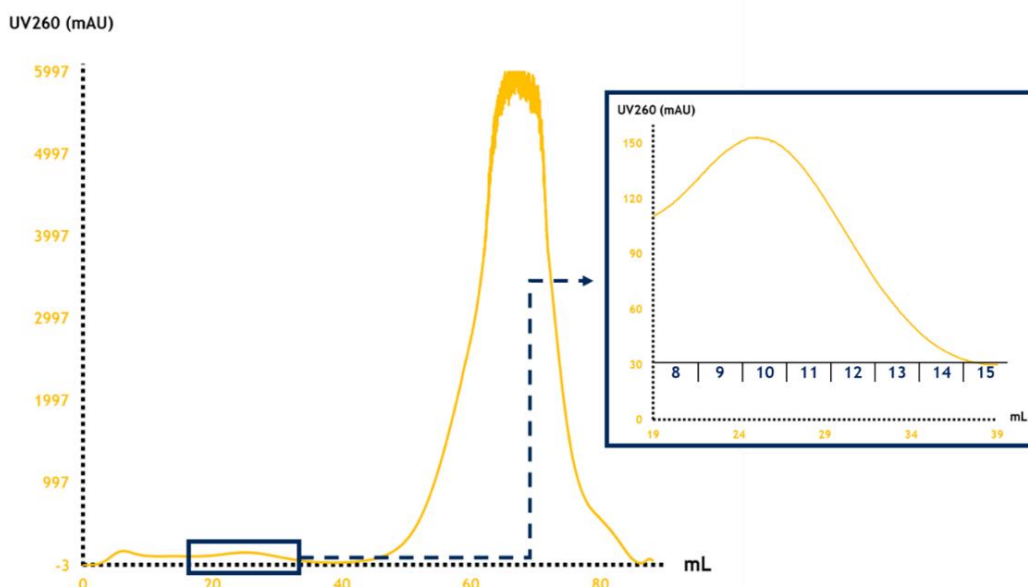


Figura 30: Cromatograma do vetor mcDNA-primiR-375 na coluna de 60cm.

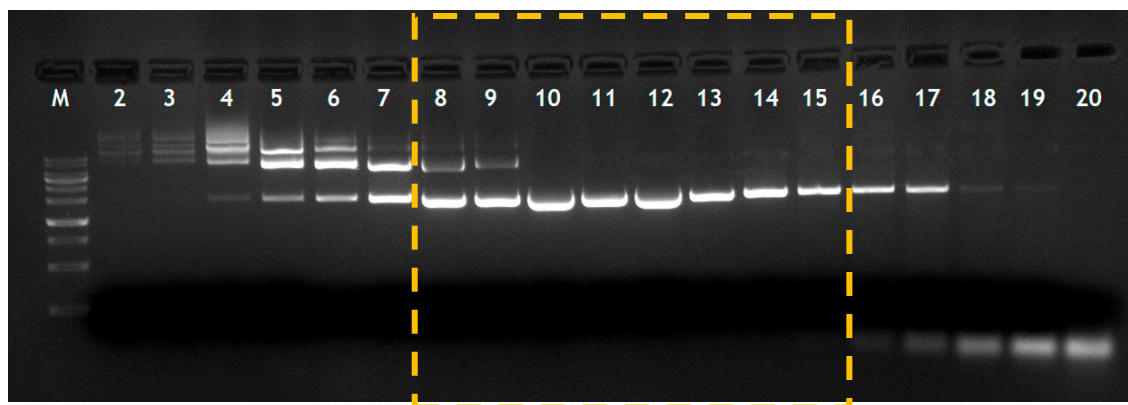


Figura 31: Eletroforese em gel de agarose correspondente ao pico do vetor de mcDNA-primiR-375.

Como o mcDNA-primiR-375 é um vetor de pequeno tamanho [4,5 Kpb] é possível uma separação mais facilitada das bandas de PP e mcDNA podendo assim recuperar maior número de frações contendo maioritariamente mcDNA com uma percentagem residual de PP. Desta forma, foram escolhidas as frações 8 a 15 onde se obteve uma massa de 100,8  $\mu\text{g}$  maioritariamente de mcDNA-primiR-375.

Como o uso desta coluna resultou muito bem para o vetor mcDNA-primiR-375, replicou-se o ensaio para os vetores mcDNA-p53 (figura 32) e mcDNA-conjugado (figura 34).

Como o vetor mcDNA-p53 [5 Kpb] é ligeiramente maior que o mcDNA-primiR-375, o processo de purificação não será tão eficaz pois no caso do mcDNA-p53 o seu tamanho maior pode aproximar a sua eluição da eluição do PP, isto pode ser comprovado ao comparar as eletroforeses de ambos os vetores, repara-se que na eletroforese do vetor mcDNA-primiR-375 (figura 31) consegue-se recuperar muito mais frações com mcDNA puro do que no vetor mcDNA-p53 (figura 33) em que se vê que nas primeiras frações há imenso mcDNA contaminado com PP e devido a isso recuperam-se poucas frações de mcDNA puro. Isto também pode ser verificado ao analisar a os picos de interesse de ambos os vetores, no caso do vetor mcDNA-primiR-375 tem uma absorvância superior a 150 mAU ao contrário do vetor p53 cujo pico de mcDNA tem absorvância inferior a 90 mAU.

Efetivamente, estas indicações são confirmadas pela quantificação da massa de mcDNA recuperada, neste caso, com a coluna de 60 cm obteve-se uma massa de 36,9  $\mu\text{g}$  de mcDNA puro. Estes resultados indicam que o tamanho superior do mcDNA-p53 em relação ao mcDNA-primiR-375 vai afetar a eficiência de separação deste tipo de molécula em relação ao seu precursor PP, acabando por co-eluir uma parte considerável de mcDNA que depois não vai ser recolhida devido à presença de PP.

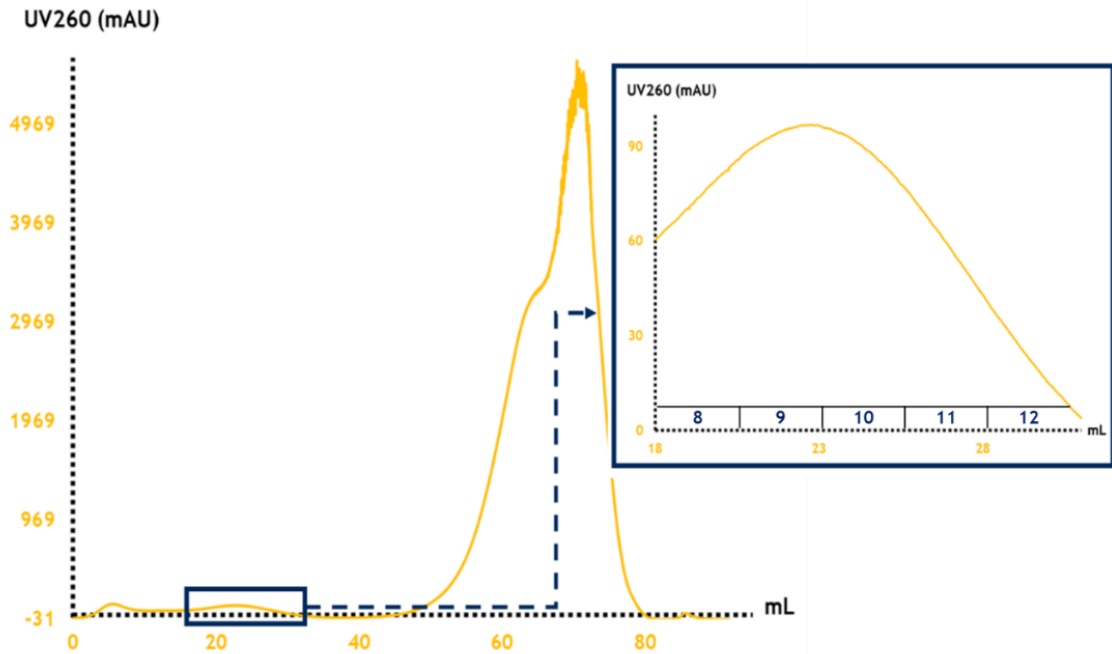


Figura 32: Cromatograma do vetor mcDNA-p53 na coluna de 60 cm.

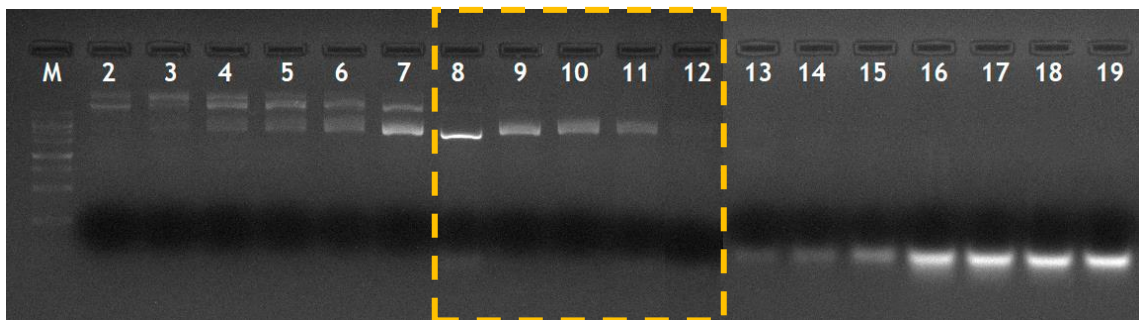


Figura 33: Eletroforese em gel de agarose correspondente ao pico do vetor de mcDNA-p53.

O caso do vetor mcDNA-conjugado [5,7 Kpb] é semelhante ao do vetor mcDNA-p53, obtendo-se uma massa de mcDNA puro de 36,6  $\mu\text{g}$  no final de todo o processo, não havendo uma correta separação entre o PP e o mcDNA (figura 35). Verificando que o mcDNA se está a perder nos primeiros passos, havendo alguma falta de resolução nestas condições cromatográficas (coluna de 60 cm). Sabendo que o tamanho da coluna é um dos parâmetros que influencia a separação decidiu-se experimentar separar os vetores mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado com uma coluna de 90 cm [58].

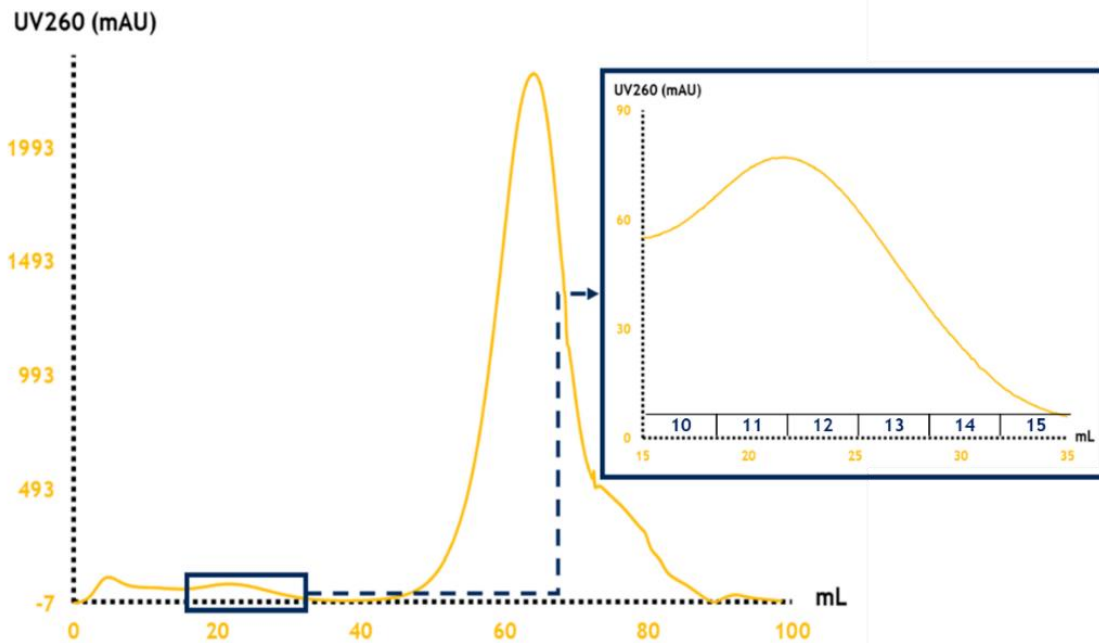


Figura 34: Cromatograma do vetor mcDNA-conjugado na coluna de 60cm.

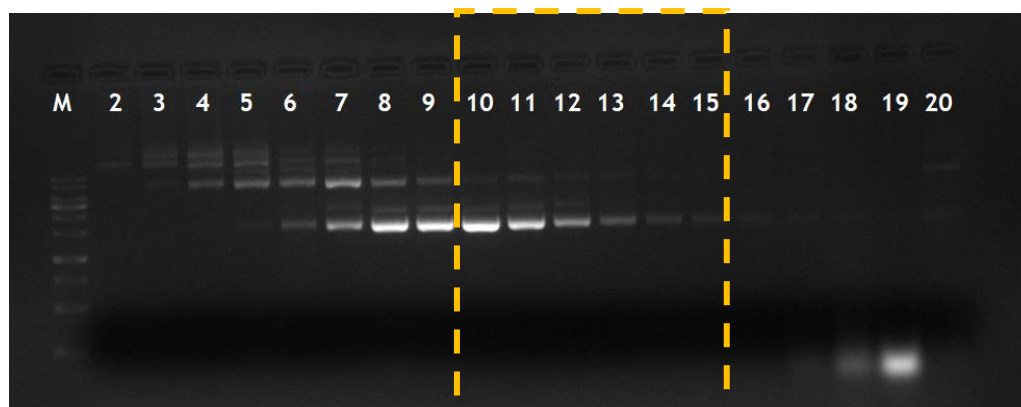


Figura 35: Eletroforese em gel de agarose de todas as frações recolhidas da cromatografia de exclusão molecular do vetor mcDNA-conjugado na coluna de 60cm. As frações correspondentes ao pico de mcDNA estão destacadas dentro do retângulo.

#### 4.3.1.2. Coluna de 90 cm

Em estudos anteriores foi comprovado que o tamanho da coluna é um dos parâmetros que influencia o desempenho da SEC, uma vez que as moléculas têm um maior caminho a percorrer o que permite às moléculas pequenas e médias estabelecerem mais interações com a coluna saindo mais desfasadas umas das outras [63]. Assim, uma vez que para os vetores mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado não se obteve uma massa significativa de mcDNA puro após a separação com a coluna de 60 cm, testou-se na coluna de 90 cm, usando o mesmo caudal de 0,3 mL/min e o mesmo os mesmos 2 mL de volume de amostra (figuras 36 e 37).

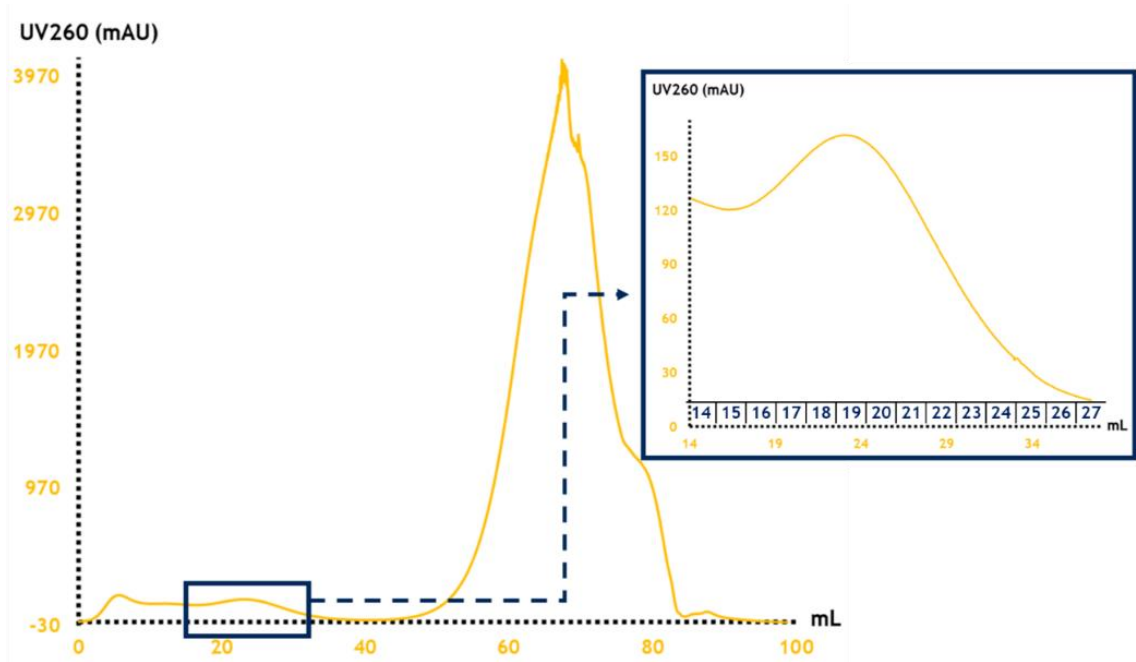


Figura 36: Cromatograma do vetor mcDNA-conjugado na coluna de 90cm.

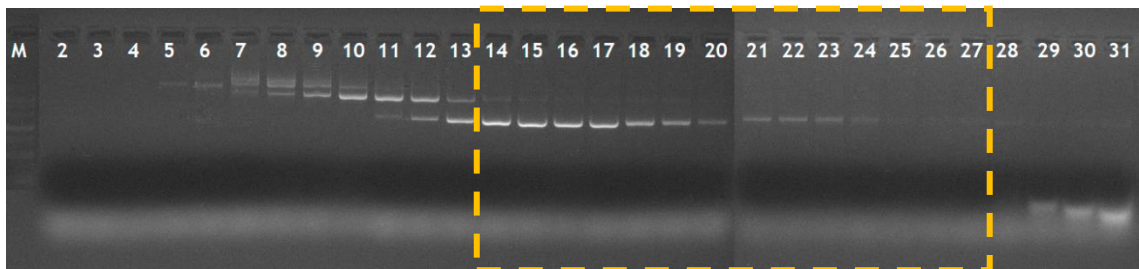


Figura 37: Eletroforese em gel de agarose de todas as frações recolhidas da cromatografia de exclusão molecular do vetor mcDNA-conjugado na coluna de 90cm. As frações correspondentes ao pico de mcDNA estão destacadas dentro do retângulo.

Comparando a eletroforese da figura 37 com a da figura 35 verifica-se que desta vez foram recuperadas mais do dobro das frações de mcDNA do que na coluna de 60 cm. Às frações de mcDNA recolhidas do pico do vetor mcDNA-conjugado sem contaminação com PP corresponde uma massa de 73,0  $\mu\text{g}$ , que é superior à massa total de 36,6  $\mu\text{g}$  obtida com a coluna de 60 cm. Além do que, pelo cromatograma apresentado na figura 32 nota-se que o pico de mcDNA apresenta maior absorvância do que na coluna de 60 cm o que está de acordo com a diferença de concentração de mcDNA obtida no final da recolha.

Em suma, pelos cromatogramas e respetivas eletroforeses apresentados acima pode-se verificar que, na coluna de 60 cm para os vetores de maior tamanho (mcDNA-conjugado [5,7 Kpb] e mcDNA-p53 [5 Kpb]), as amostras correspondentes ao pico de interesse ainda continham uma certa contaminação por vetor parental, experimentando-se para este caso uma coluna maior de 90 cm (exemplificado para o vetor mcDNA-conjugado). Enquanto que

para os outros vetores de menor tamanho (mcDNA-primiR-375 [4,5 Kpb] e mcDNA-vazio [3,8 kpb]) já se obtiveram resultados com boas concentrações de mcDNA puro na coluna de 60 cm (exemplificado para o mcDNA-primiR-375). Tendo em conta tudo o que já foi referenciado anteriormente em relação aos parâmetros a utilizar na SEC para se obter uma ótima separação da amostra e analisando os resultados obtidos percebe-se que o tamanho da coluna é de facto um parâmetro determinante para a boa separação dos vetores de maior tamanho mantendo o mesmo volume de amostra injetado e o mesmo caudal [63].

## **4.4. Estudos *in vitro***

### **4.4.1. Ensaio de Viabilidade Celular**

Para avaliar se os vetores de mcDNA purificados pelo processo anteriormente descrito induzem alguma citotoxicidade, foram realizados estudos de viabilidade celular em células cancerígenas (CasKi) e não cancerígenas (FibH) às 24, 36, 48 e 72 h (figura 38).

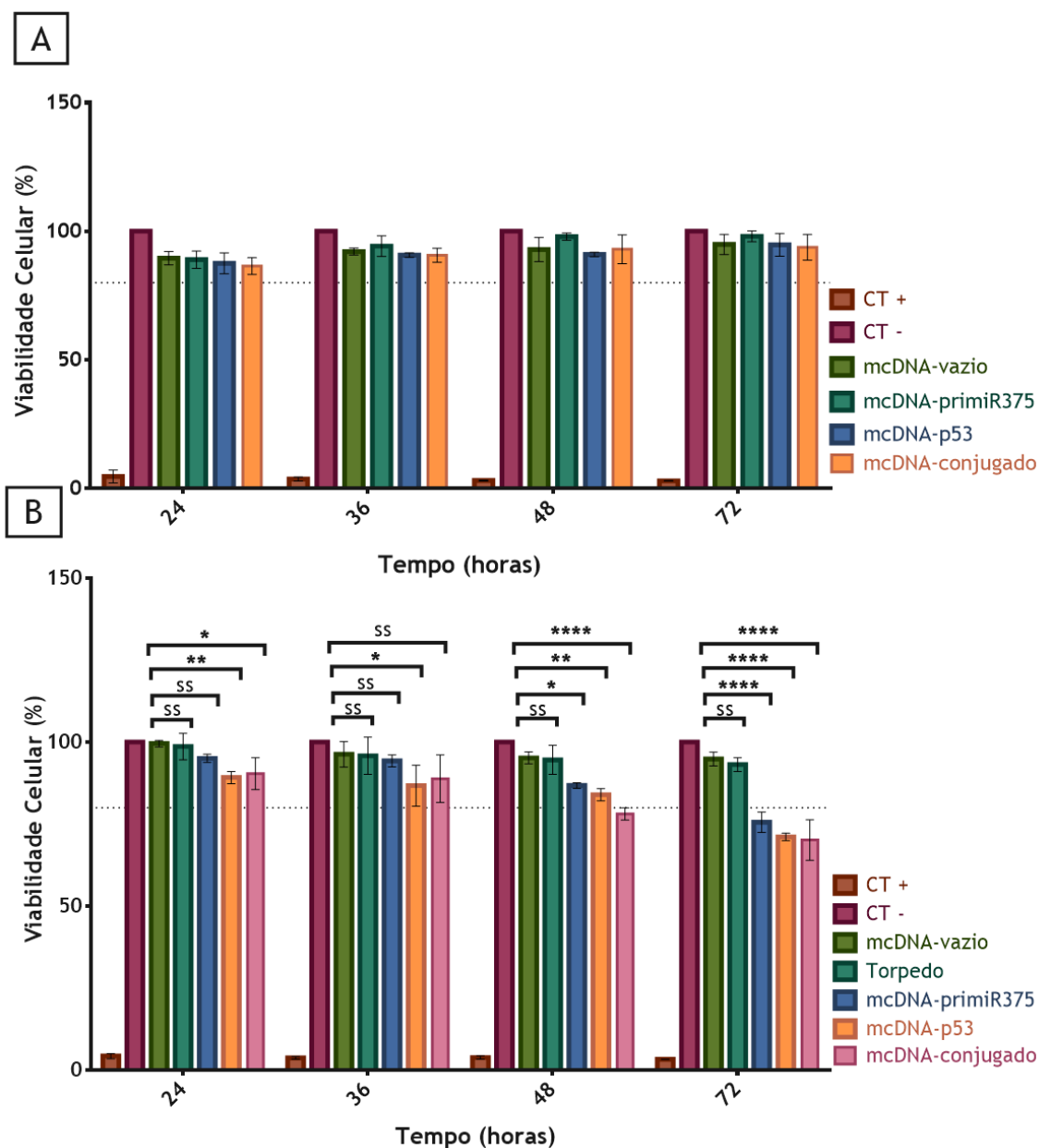


Figura 38: Percentagens de viabilidade celular em FibH (A) e em células CaSki (B), após transfecções com os vetores durante 24, 36, 48 e 72 horas. Os ensaios foram realizados com um n = 3 e a análise estatística foi realizada com o teste two-way ANOVA. Encontram-se representadas as significâncias estatísticas (\*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001; SS - sem significância).

Como podemos verificar pela figura 38, o ensaio com FibH (A) indica-nos viabilidades acima dos 80% e os resultados não apresentaram significância estatística quando comparados com o controlo negativo, pelo que podemos afirmar que os nossos vetores não estão a induzir toxicidade celular. No ensaio com células cancerígenas CaSki (B) podemos verificar que:

- ✓ as células transfetadas com o vetor vazio parecem diminuir ligeiramente a viabilidade ao longo do tempo em relação ao controlo negativo. Contudo pelo ensaio somente com o reagente de transfeção (torpedo) verificou-se exatamente a mesma influência sugerindo assim que o vetor de mcDNA vazio não tem qualquer ação citotóxica para as células cancerígenas ou não cancerígenas;
- ✓ o vetor mcDNA-p53 e o vetor mcDNA-conjugado começam a diminuir a viabilidade a partir das 24 h e o vetor mcDNA-primiR-375 a partir das 48 h, sendo que, a longo prazo (72 h), o mcDNA-conjugado é o que apresenta uma maior redução da viabilidade celular. Como este efeito não se verifica em células não cancerígenas e, tendo em conta a ação esperada destes vetores, pode ser devido ao efeito terapêutico pretendido com o início da atividade dos vetores.

#### 4.4.2. Ensaio de Proliferação Celular

Como ensaio complementar para corroborar o que se observou da viabilidade celular foi realizado um ensaio de proliferação com os diferentes vetores e para as mesmas horas mas somente com células cancerígenas (figura 39) uma vez que já se confirmou que os vetores não afetam a viabilidade celular de células não cancerígenas.

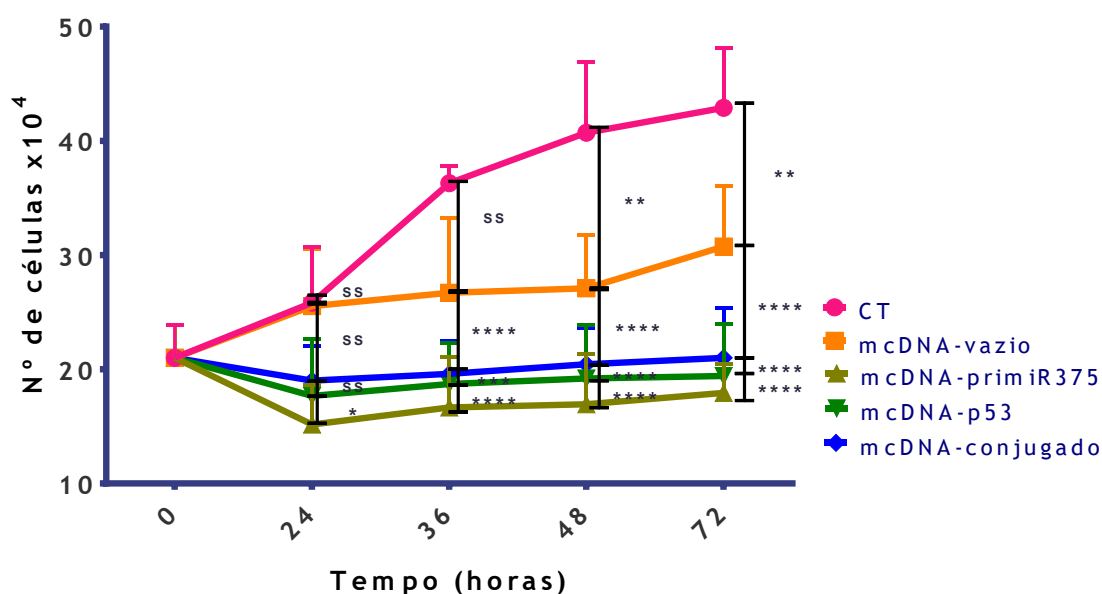


Figura 39: Ensaio de proliferação com células CaSki transfetadas com os vetores durante 24, 36, 48 e 72 horas, em comparação com células não-transfetadas (controlo). Os ensaios foram realizados com um n = 3 e a análise estatística foi realizada com o teste two-way ANOVA. A significância estatística foi realizada com a comparação dos diferentes vetores em relação ao controlo e os resultados apresentam uma significância às 72H de P < 0,0001 (\*\*\*\*) para os vetores terapêuticos em relação ao controlo.

Pela figura acima podemos verificar que o comportamento dos vetores é semelhante ao observado no ensaio de citotoxicidade, ou seja, uma redução na proliferação das células transfetadas em relação ao controlo de células não transfetadas. No entanto, o vetor mcDNA-vazio apresenta menor proliferação em relação ao controlo, o que pode ser devido ao stress/toxicidade provocado nas células pela transfeção com o reagente Torpedo comprovada no ensaio anterior. É importante realçar que este ensaio está sujeito a muito erro associado à manipulação pelo investigador, pelo que os resultados devem ser comprovados por outros estudos.

Para se perceber melhor este efeito dos genes terapêuticos contidos em cada vetor de mcDNA foram realizados estudos transfeção para posteriormente extrair os transcritos de p53, E6 e E7 e avaliar por RT-PCR e RT-qPCR.

#### 4.4.3. RT-PCR e RT-qPCR

Para perceber se as células CaSki eram de facto o modelo de células cancerígenas do colo do útero ideal para realizar as experiências deste trabalho, foi realizado um RT-PCR para comparar o nível de transcritos da oncoproteína E6 do PHV em células HeLa, CaSki e SiHa infetadas por HPV não transfetadas, tal como demonstrado pela figura 40.

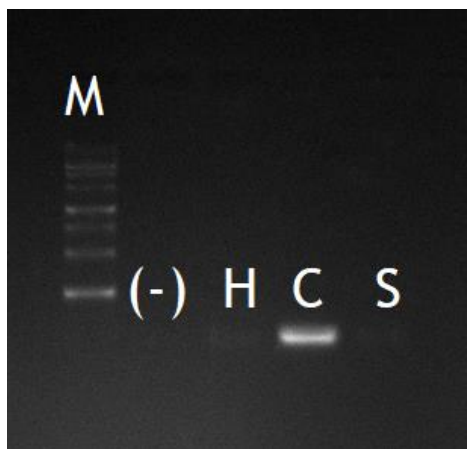


Figura 40: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR das comparações do nível de transcritos de E6 entre as células HeLa (H), CaSki (C) e SiHa (S).

As células Caski, derivadas do cancro cervical metastizadas no mesentério do intestino delgado [73], foram selecionadas como o modelo de células cancerígenas para este estudo devido ao seu elevado nível de cópias de genoma do HPV16 integrado (60-600) em comparação com outros dois modelos celulares de cancro cervical infetados com HPV, as HeLa (provenientes de adenocarcinoma cervical infetado com HPV18, contendo 10-50 cópias) e as SiHa (provenientes de carcinoma cervical infetado com HPV16, contendo 1-2 cópias) [74]. Tal como podemos comprovar na figura 40, as células CaSki apresentam maiores quantidades dos transcritos de E6 em relação aos outros dois modelos.

Pelo resultado anterior confirmou-se que as células CaSki apresentam um nível muito elevado dos transcritos das oncoproteínas do HPV, o que sugere serem as células indicadas para avaliar a influência dos vetores terapêuticos no silenciamento destes transcritos. Desta forma foram realizadas experiências de transfeção com os vetores mcDNA-p53, mcDNA-primiR-375 e mcDNA-conjugado às 24 horas de transfeção em células CaSki. A primeira destas experiências serviu para detecção dos níveis dos transcritos de E6 e E7, em células cancerígenas do colo do útero não transfetadas e transfetadas com mcDNA-primiR-375, mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado (figura 41).

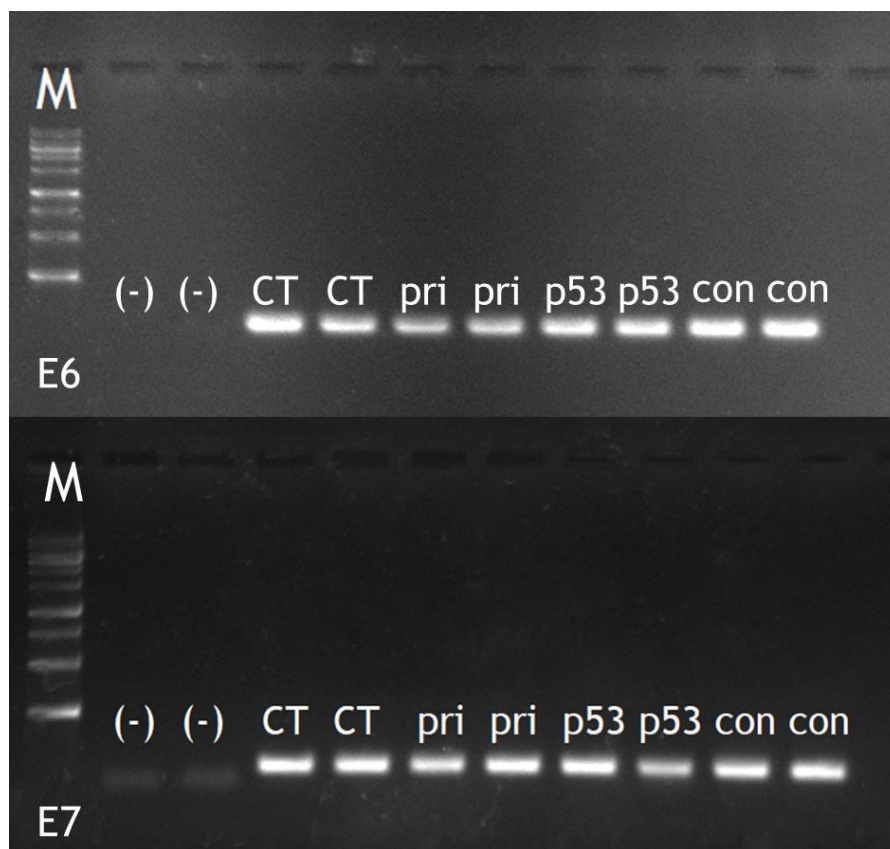


Figura 41: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR da comparação dos níveis de transcritos de E6 e E7 entre células não transfetadas (CT) e células 24 h após transfeção em células CaSki com os vetores mcDNA-primiR-375, mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado.

Analisando a figura 41 verificamos que os vetores que melhor atuam para conseguir a diminuição dos transcritos de E6 e E7 após 24 h de transfeção são o mcDNA-primiR-375 e o mcDNA-conjugado. No entanto, através da técnica de RT-PCR não conseguimos determinar muito bem o grau de intensidade das bandas pelo que é necessário um método mais rigoroso que nos confirme quantitativamente aquilo que queremos observar. Para isto procedemos à técnica de RT-qPCR (figuras 42 e 43).

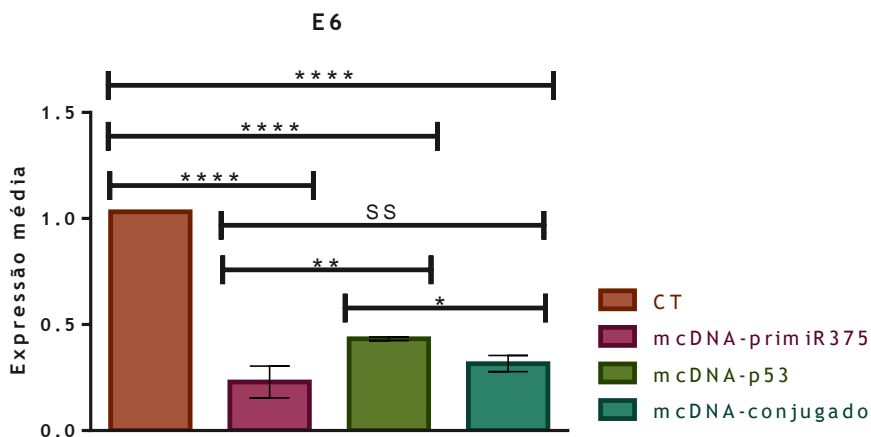


Figura 42: PCR quantitativo (RT-qPCR) da expressão média dos transcritos de E6 com cada um dos vetores em relação ao controlo.

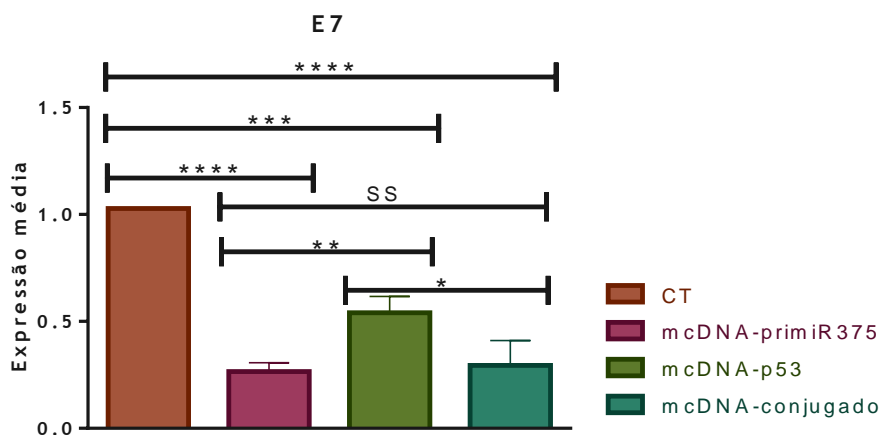


Figura 43: PCR quantitativo (RT-qPCR) da expressão média dos transcritos de E6 com cada um dos vetores em relação ao controlo.

Pelas figuras 42 e 43 podemos verificar uma diminuição de expressão dos transcritos E6 e E7 respetivamente das células transfetadas às 24 h com cada um dos vetores em relação ao controlo de células não transfetadas (CT), o que já era esperado, uma vez que o miR-375 já foi reportado como redutor dos níveis de E6 e E7 [47] e vai de encontro aos estudos de viabilidade e proliferação celular nos quais se nota o possível efeito terapêutico dos vetores, agora mais acentuado. O mcDNA-conjugado tem um comportamento semelhante ao mcDNA-primiR-375 na redução dos transcritos de E6 e E7 embora não seja tão acentuado provavelmente porque no mcDNA-conjugado o gene primiR-375 foi clonado num segundo promotor que pode ter uma atividade de expressão do gene alvo diferente do primeiro promotor, tal como podemos verificar pela figura 44. Quanto à diminuição nos níveis de transcritos de E6 e E7 com o vetor mcDNA-p53 este comportamento é um tanto curioso e não se percebe muito bem o porquê, sendo necessária a realização de estudos adicionais.

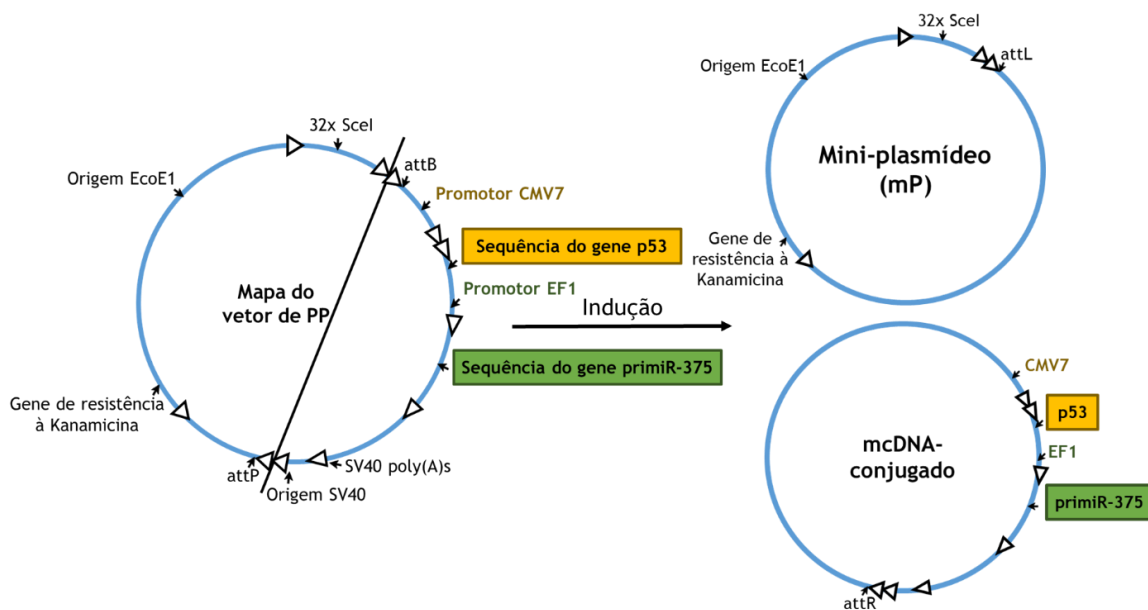


Figura 44: Representação esquemática da indução do vetor parental no vetor de mcDNA-conjugado com o lugar dos genes e respetivos promotores.

Posteriormente, foram avaliados os transcritos de p53 também por RT-PCR e ao contrário do que acontece com os transcritos de E6 e E7, pretende-se aumentar os níveis de p53 através do efeito dos nossos vetores terapêuticos para que haja uma sobre expressão de p53 e daí se possa desencadear a apoptose celular (figura 45).

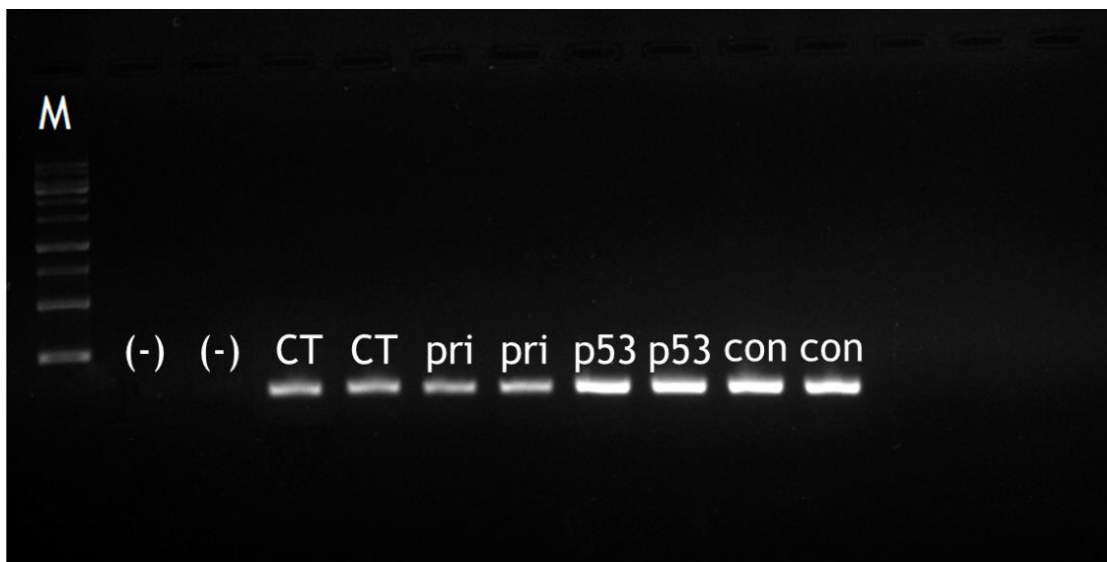


Figura 45: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR da comparação dos níveis de transcritos de p53 entre células não transfetadas (CT) e células 24H após transfeção em células CaSki com os vetores mcDNA-primiR-375, mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado.

As células transfetadas com mcDNA-pri-miR-375 não parecem ter alterado o nível dos transcritos de p53 em relação às células não transfetadas, isto porque, o vetor mcDNA-primiR-375 terá um efeito terapêutico no sentido de inibir a expressão da oncoproteína E6 que por sua vez deixa de marcar a proteína p53 para degradação, no entanto ele não terá efeito ao nível dos transcritos mas sim em relação à proteína produzida, portanto, como não interfere diretamente com os transcritos de p53, é normal que não se note diferença nos seus níveis em relação às células não transfetadas, no entanto seria interessante futuramente realizar a confirmação do efeito na expressão proteica. Quanto às células transfetadas com mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado apresentam uma banda mais intensa de transcritos de p53, provavelmente devido à expressão do gene p53 induzida por ambos os vetores. No entanto, para melhor comprovar o que se vê pela eletroforese da figura 45 foi realizado um RT-qPCR representado abaixo pela figura 46.

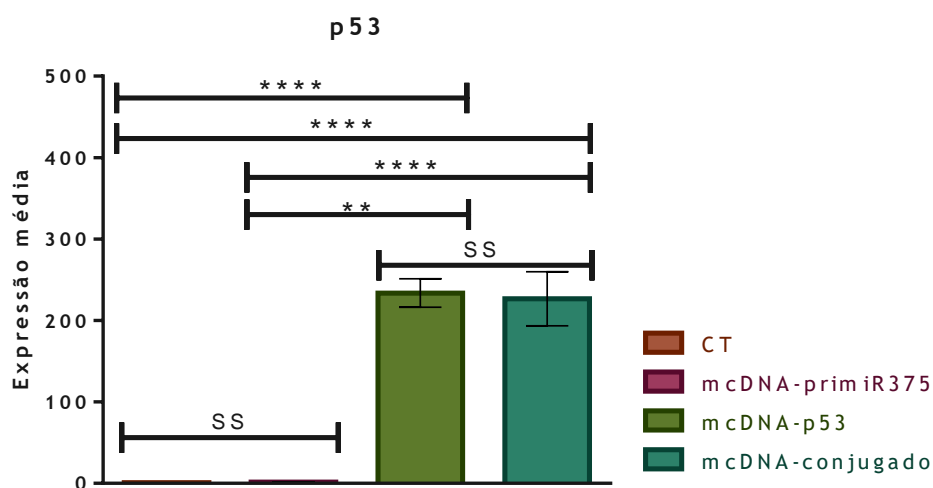


Figura 46: PCR quantitativo (RT-qPCR) da expressão média dos transcritos de p53 com cada um dos vetores em relação ao controle.

Esta técnica veio confirmar o que foi verificado através da técnica de RT-PCR e para o p53 isto significou um aumento evidente com os vetores mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado, o que, como esperado, já não aconteceu para o vetor mcDNA-primiR-375.

Neste trabalho pretendeu-se suplementar os níveis de p53 induzindo a expressão desta proteína com vetores de mcDNA que codificam o gene de p53. Já tinha sido também demonstrado por Cho e co-autores que uma regulação de modo a diminuir os níveis de E6 poderia levar também a uma estabilização da p53 [74]. Em outros estudos já tinha sido reportada a repressão de E6 e E7 com vários tipos de RNA que resultou indiretamente na recuperação dos níveis de p53, induzindo assim a apoptose de células CaSki [75]-[77], sendo também observada a supressão do crescimento das CaSki com o uso de veneno de abelha, existindo uma diminuição nos níveis de mRNA de HPV16 E6 e E7 e também das proteínas após 24 h de introdução do veneno nas células [78].

Estes resultados, em concordância com os estudos de proliferação e citotoxicidade, sugerem que os nossos vetores, não sendo tóxicos para as células, reduzem a proliferação das células CaSki possivelmente pela apoptose induzida pelo vetor mcDNA-p53 e mcDNA-conjugado e pela inibição de E6 e E7 exercida pelos vetores mcDNA-primiR-375 e mcDNA-conjugado que, neste caso vão deixar de inibir a pRB que por sua vez passa a controlar o ciclo celular na fase S [47].

## **Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras**



As infeções pelo vírus do HPV e os casos de cancro do colo do útero associados a estas infeções têm vindo a aumentar com o passar dos anos e é necessário adotar as estratégias necessárias para tentar reverter as situações em que a infeção já está numa fase avançada. A terapia génica tem ganho importância na comunidade científica por existirem cada vez mais estudos a comprovar a sua eficácia. Este tipo de terapia aliada ao inovador vetor de DNA minicircular para a entrega de genes alvo surge assim como uma combinação promissora.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção e purificação de quatro vetores de mcDNA, três dos quais com possíveis genes terapêuticos para serem testados e avaliados em células cancerígenas do colo do útero.

Neste trabalho foi explorada e otimizada a purificação de mcDNAs de diferentes tamanhos moleculares. Verificou-se que para os vetores de maior tamanho em que o processo de indução por si só não tem um elevado rendimento, é necessária uma extração modificada prévia para reduzir os contaminantes da amostra de lisado e posteriormente o uso de uma coluna cromatográfica, ajustando as condições e eluição e altura da coluna de forma a permitir a separação dos pares PP e respetivo mcDNA por cromatografia de exclusão molecular.

Por fim, os vetores foram testados nas células cancerígenas do colo do útero (CaKi) para avaliar a alteração dos níveis dos transcritos, aumento de p53 e diminuição de E6 e E7, numa fase inicial por RT-PCR e posteriormente por RT-qPCR para avaliar quantitativamente os níveis de expressão dos transcritos o que veio reforçar um possível efeito terapêutico dos vetores. Verificou-se que o vetor mcDNA-conjugado induz um efeito semelhante ao do vetor mcDNA-p53, mas não tão acentuado em relação ao vetor mcDNA-primiR-375 talvez pelo facto de se encontrar num promotor diferente, contudo a sua eficácia é realçada quando aliamos estes estudos aos de citotoxicidade e proliferação onde se verificou que o vetor mcDNA-conjugado apresenta um efeito ligeiramente mais evidente do que o dos vetores isolados.

Em jeito de conclusão, através deste trabalho foi verificado que o DNA minicircular é de facto uma forma inovadora de terapia génica, podendo estar ainda sujeito a alguma otimização a nível da sua produção e purificação para obter rendimentos maiores. Todos os vetores terapêuticos aqui analisados induziram de facto efeito nas células cancerígenas CaKi e o vetor mcDNA-conjugado mostrou ser uma boa alternativa a longo prazo aos vetores isolados, sujeito a estudos com maior número de n's. Todavia, será necessária adicionalmente a confirmação por Western Blot de que as diferenças observadas nos transcritos de E6, E7 e p53 se mantêm no nível de expressão das respetivas proteínas. Futuramente seria interessante realizar ensaios de apoptose para perceber melhor os efeitos do vetor mcDNA-p53 e do mcDNA-conjugado na indução da morte celular.



## Referências

- [1] G. M. Cooper, R. E. Hausman, and R. E. Hausman, *The cell: a molecular approach*, vol. 10. ASM press Washington, DC, 2000.
- [2] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, “Molecular biology of the cell: Reference edition,” 2007.
- [3] C. A. Kaiser, M. Krieger, H. Lodish, and A. Berk, *Molecular cell biology*. WH Freeman, 2007.
- [4] M. M. Fidler, F. Bray, and I. Soerjomataram, “The global cancer burden and human development : A review,” no. May, pp. 1-10, 2017.
- [5] Y. Derbal, “Perspective on the dynamics of cancer,” pp. 1-18, 2017.
- [6] S. Asia, S. Asia, and H. Hdi, “Cervix uteri,” vol. 876, pp. 2018-2019, 2019.
- [7] T. A. Kessler, “Cervical Cancer: Prevention and Early Detection,” *Semin. Oncol. Nurs.*, vol. 33, no. 2, pp. 172-183, 2017.
- [8] A. Pista, C. F. De Oliveira, M. J. Cunha, M. T. Paixao, and O. Real, “Prevalence of human papillomavirus infection in women in Portugal the CLEOPATRE Portugal study,” *Int. J. Gynecol. Cancer*, vol. 21, no. 6, pp. 1150-1158, 2011.
- [9] R. Rocha and N. Verdasca, “\_ Primeiro estudo em Portugal sobre a identificação dos genótipos do vírus do papiloma humano ( HPV ) numa população feminina vacinada com atividade sexual ativa,” *Obs. Bol. Epidemiológico*, vol. 51, pp. 4-9, 2017.
- [10] S. V. Graham, “The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review,” *Clin. Sci.*, vol. 131, no. 17, pp. 2201-2221, 2017.
- [11] C. Chelimo, T. A. Wouldes, L. D. Cameron, and J. M. Elwood, “Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer,” *J. Infect.*, vol. 66, no. 3, pp. 207-217, 2013.
- [12] N. S. L. Yeo-teh, Y. Ito, and S. Jha, “High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis,” 2018.
- [13] V. Tomaić, “Functional roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies at diverse anatomical sites,” *Cancers (Basel)*, vol. 8, no. 10, 2016.

- [14] M. Polz-dacewicz, "ScienceDirect Human Papillomavirus ( HPV ) - Structure , epidemiology and pathogenesis," pp. 1-7, 2014.
- [15] S. Fischer *et al.*, "Shift in prevalence of HPV types in cervical cytology specimens in the era of HPV vaccination," pp. 601-610, 2016.
- [16] D. Viariso, L. Gissmann, and M. Tommasino, "Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 26, pp. 56-62, 2017.
- [17] M. Bienkowska-haba *et al.*, "A new cell culture model to genetically dissect the complete human papillomavirus life cycle," pp. 1-21, 2018.
- [18] M. Schiffman, J. Doorbar, N. Wentzensen, B. J. Monk, M. A. Stanley, and S. Franceschi, "Carcinogenic human papillomavirus infection," 2016.
- [19] M. A. Oyervides-Muñoz *et al.*, "Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 61, no. March, pp. 134-144, 2018.
- [20] K. Hoppe-Seyler, F. Bossler, J. A. Braun, A. L. Herrmann, and F. Hoppe-Seyler, "The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets," *Trends Microbiol.*, vol. xx, pp. 1-11, 2017.
- [21] D. Estêvão, N. Rios, R. M. Gil, and R. Medeiros, "BBA - Gene Regulatory Mechanisms Hallmarks of HPV carcinogenesis : The role of E6 , E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy," *BBA - Gene Regul. Mech.*, vol. 1862, no. 2, pp. 153-162, 2019.
- [22] C. Zhang, Q. Wang, H. Liu, Z. Zhang, and W. Huang, "Gene Delivery Systems Non 鄧 viral systems," pp. 182-188, 2011.
- [23] J. Zhao *et al.*, "Synthesis of Amphiphilic Poly(B-amino ester) for Efficiently Minicircle DNA Delivery in Vivo," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 30, pp. 19284-19290, 2016.
- [24] X. M. Anguela and K. A. High, "Entering the Modern Era of Gene Therapy," 2019.
- [25] A. M. Almeida, J. A. Queiroz, F. Sousa, and Â. Sousa, "Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins," *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 10, pp. 2044-2057, 2019.
- [26] 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, pp. 1-16, 2018.

- [27] S. M. Ip, T. G. Huang, W. S. B. Yeung, and H. Y. S. Ngan, "pRb-expressing adenovirus Ad5-Rb attenuates the p53-induced apoptosis in cervical cancer cell lines," *Eur. J. Cancer*, vol. 37, no. 18, pp. 2475-2483, 2001.
- [28] R. J. Duronio and Y. Xiong, "Signaling pathways that control cell proliferation," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 3, 2013.
- [29] N. Prabhu, K. Somasundaram, K. Satyamoorthy, M. Herlyn, and W. S. El-Deiry, "p73B, unlike p53, suppresses growth and induces apoptosis of human papillomavirus E6-expressing cancer cells," *Int. J. Oncol.*, vol. 13, no. 1, pp. 5-9, 1998.
- [30] S. Das, W. S. El-Deiry, and K. Somasundaram, "Efficient growth inhibition of HPV 16 E6-expressing cells by an adenovirus-expressing p53 homologue p73B," *Oncogene*, vol. 22, no. 52, pp. 8394-8402, 2003.
- [31] S. Das and K. Somasundaram, "Therapeutic potential of an adenovirus expressing p73B, a p53 homologue, against human papilloma virus positive cervical cancer in vitro and in vivo," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 210-217, 2006.
- [32] Y. S. Guan, Y. Liu, L. Sun, X. Li, and Q. He, "Successful management of postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma with p53 gene therapy combining transcatheter arterial chemoembolization," *World J. Gastroenterol.*, vol. 11, no. 24, pp. 3803-3805, 2005.
- [33] X. Su *et al.*, "Effect and Safety of Recombinant Adenovirus-p53 Transfer Combined with Radiotherapy on Long-Term Survival of Locally Advanced Cervical Cancer," *Hum. Gene Ther.*, vol. 27, no. 12, pp. 1008-1014, 2016.
- [34] W. W. Zhang *et al.*, "The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic," *Hum. Gene Ther.*, vol. 29, no. 2, pp. 160-179, 2018.
- [35] A. L. Manning and N. J. Dyson, "RB: Mitotic implications of a tumour suppressor," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 3, pp. 220-226, 2012.
- [36] Y. Jiang and W. K. Chu, "Potential Roles of the Retinoblastoma Protein in Regulating Genome Editing," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 6, no. July, pp. 1-6, 2018.
- [37] F. Meng, J. Qian, H. Yue, X. Li, and K. Xue, "SUMOylation of Rb enhances its binding with CDK2 and phosphorylation at early G1 phase," *Cell Cycle*, vol. 15, no. 13, pp. 1724-1732, 2016.
- [38] S. Review, "Role of p53 isoforms and aggregations in cancer," 2016.


- [39] T. Stokłosa and J. Gołab, "Prospects for p53-based cancer therapy," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 52, no. 2, pp. 321-328, 2005.
- [40] D. W. Meek, "Regulation of the p53 response and its relationship to cancer 1," pp. 325-346, 2015.
- [41] C. Genomics, "Nature 2004.pdf," pp. 931-945, 2001.
- [42] N. Carolina and C. Hill, "Eulogy for Junk DNA," *Genomics*, vol. 9, no. 37, pp. 1159-1161, 2012.
- [43] A. Rnas, I. Daugaard, and T. B. Hansen, "Biogenesis and Function of," *Trends Genet.*, vol. 33, no. 3, pp. 208-219, 2017.
- [44] M. Chen, G. A. Calin, and Q. H. Meng, *Circulating microRNAs as promising tumor biomarkers*, 1st ed., vol. 67. Elsevier Inc., 2014.
- [45] F. Wang, Y. Li, and J. Zhou, "miR-375 Is Down-Regulated in Squamous Cervical Cancer and Inhibits Cell Migration and Invasion via Targeting Transcription Factor SP1," vol. 179, no. 5, pp. 2580-2588, 2011.
- [46] C. D. Ancona, T. Dorandi, G. Endreb, P. Hoffmann, H. H. Roche, and J. H., *Edited by*, vol. 0. 2007.
- [47] H. M. Jung, B. L. Phillips, and E. K. L. Chan, "miR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6 / E7 , miR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6 / E7 ," *Mol. Cancer*, vol. 13, no. 1, pp. 1-15, 2014.
- [48] H. He *et al.*, "Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on February 8 , 2019 by guest," no. 29, 2019.
- [49] L. Gao *et al.*, "Efficacy of MRI visible iron oxide nanoparticles in delivering minicircle DNA into liver via intrabiliary infusion," *Biomaterials*, vol. 34, no. 14, pp. 3688-3696, 2013.
- [50] D. De Melo-diogo, E. Costa, F. Sousa, and C. Pichon, "Minicircle DNA vectors for gene therapy : advances and applications," pp. 1-27, 2015.
- [51] P. Huang *et al.*, "Biomaterials Science Erythrocyte membrane based cationic polymer-mcDNA complexes as an efficient gene delivery," 2016.
- [52] M. Schleaf, *Minicircle and miniplasmid dna vectors: the future of non-viral and viral gene transfer*. John Wiley & Sons, 2013.

- [53] N. Nafissi and M. Foldvari, "Neuroprotective therapies in glaucoma: II . Genetic nanotechnology tools," vol. 9, no. October 2015, pp. 1-16, 2015.
- [54] A. Simple, "HHS Public Access," vol. 28, no. 12, pp. 1287-1289, 2014.
- [55] N. Nafissi and R. Slavcev, "Bacteriophage recombination systems and biotechnical applications," 2014.
- [56] P. Mayrhofer, M. Blaesen, M. Schleef, and W. Jechlinger, "Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein - DNA interaction chromatography," no. July, pp. 1253-1269, 2008.
- [57] V. M. Gaspar, C. J. Maia, J. A. Queiroz, C. Pichon, I. J. Correia, and F. Sousa, "Improved Minicircle DNA Biosynthesis for Gene Therapy Applications," *Hum. Gene Ther. Methods*, vol. 25, no. 2, pp. 93-105, 2014.
- [58] GE Healthcare, *Size exclusion chromatography*. 2012.
- [59] GE Healthcare, *Affinity Chromatography*No Title. 2012.
- [60] GE Healthcare, *Ion Exchange Chromatography*. 2012.
- [61] GE Healthcare, *Hydrophobic Interaction Chromatography*. 2012.
- [62] GE Healthcare, *Reversed Phase Chromatography*. 2012.
- [63] A. M. Almeida, D. Eusébio, J. A. Queiroz, F. Sousa, and A. Sousa, "The use of size-exclusion chromatography in the isolation of supercoiled minicircle DNA from *Escherichia coli* lysate," *J. Chromatogr. A*, no. xxxx, p. 460444, 2019.
- [64] A. M. Almeida, J. Tomás, P. Pereira, J. A. Queiroz, F. Sousa, and Â. Sousa, "HPV-16 targeted DNA vaccine expression: The role of purification," *Biotechnol. Prog.*, vol. 34, no. 2, pp. 546-551, 2018.
- [65] M. A. Liebert, Z. Chen, C. He, and M. A. Kay, "Improved Production and Purification of Minicircle DNA Vector Free of Plasmid Bacterial Sequences and Capable of Persistent Transgene Expression In Vivo," vol. 131, no. January, pp. 126-131, 2005.
- [66] X. H. Hou, X. Y. Guo, Y. Chen, C. He, and Z. Chen, "Increasing the minicircle DNA purity using an enhanced triplex DNA technology to eliminate DNA contaminants," no. November 2014, pp. 2-7, 2015.
- [67] L. Brito, G. A. Monteiro, C. P. A. Alves, M. Sim˜, and D. M. F. Prazeres, "Article in press," 2016.


- [68] T. Diamantino, P. Pereira, J. A. Queiroz, Â. Sousa, and F. Sousa, "Minicircle DNA purification using a CIM® DEAE-1 monolithic support," *J. Sep. Sci.*, vol. 39, no. 18, pp. 3544-3549, 2016.
- [69] A. M. Almeida, J. A. Queiroz, F. Sousa, and A. Sousa, "Minicircle DNA purification: Performance of chromatographic monoliths bearing lysine and cadaverine ligands," vol. 1119, no. March, pp. 7-16, 2019.
- [70] A. M. Required and I. Guidelines, "Note : Note :," vol. 0, pp. 1-4, 2016.
- [71] A. M. Almeida, J. A. Queiroz, F. Sousa, and Â. Sousa, "Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins," *Drug Discov. Today*, vol. 00, no. 00, pp. 1-14, 2019.
- [72] S. S. Freitas, J. A. L. Santos, and D. M. F. Prazeres, "Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA," *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, no. 4, pp. 1179-1186, 2006.
- [73] R. A. Pattillo, R. O. Hussa, M. T. Story, A. C. F. Ruckert, M. R. Shalaby, and R. F. Mattingly, "TUMOR ANTIGEN AND HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN IN CaSKI CELLS," *Obstet. Gynecol. Surv.*, vol. 33, no. 1, pp. 56-57, 1978.
- [74] C. W. Cho *et al.*, "HPV E6 antisense induces apoptosis in CaSki cells via suppression of E6 splicing," *Exp. Mol. Med.*, vol. 34, no. 2, pp. 159-166, 2002.
- [75] L. Li *et al.*, "E6 and E7 gene silencing results in decreased methylation of tumor suppressor genes and induces phenotype transformation of human cervical carcinoma cell lines," *Oncotarget*, vol. 6, no. 27, pp. 23930-23943, 2015.
- [76] X. Y. Niu, Z. L. Peng, W. Q. Duan, H. Wang, and P. Wang, "Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference in vitro and in vivo," *Int. J. Gynecol. Cancer*, vol. 16, no. 2, pp. 743-751, 2006.
- [77] A. L. Jonson, L. M. Rogers, S. Ramakrishnan, and L. S. Downs, "Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer," *Gynecol. Oncol.*, vol. 111, no. 2, pp. 356-364, 2008.
- [78] S. Chen *et al.*, "APOBEC3A possesses anticancer and antiviral effects by differential inhibition of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, no. 7, pp. 10548-10557, 2015.

# ANEXO I

**Comunicação em forma de poster** no “III International Congress In Health Sciences Research Towards Innovation and Entrepreneurship: Trends in Aging and Cancer” - CICS-UBI, Covilhã (2019): Diana Pereira, Adriana Pinto, Dalinda Eusébio, Ana M. Almeida, João A. Queiroz, Fani Sousa, Ângela Sousa. Production and Purification of Minicircular DNA Vectors For Use in Cervical Cancer Cells.



**CICS-UBI**  
Centro de Investigação em Ciências da Saúde  
Health Sciences Research Centre



FACULDADE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE

## Production and Purification of Minicircular DNA Vectors For Use in Cervical Cancer Cells

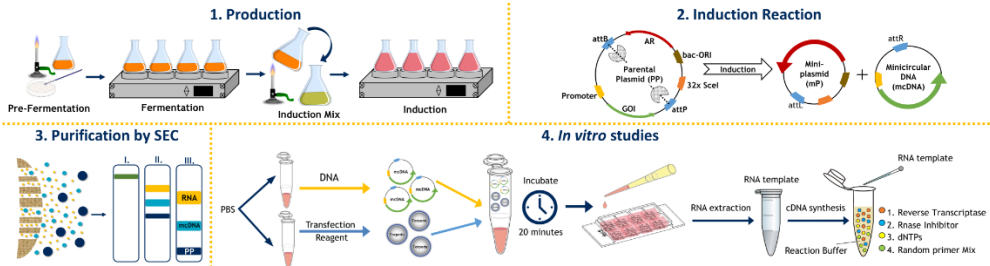
**D. Pereira-Carvalho\***, A. Resende-Pinto, D. Eusebio; A.M. Almeida; J.A. Queiroz; F. Sousa; A. Sousa

CICS-UBI - Health Sciences Research Center, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal  
\*Email: diana.pereira@ubi.pt

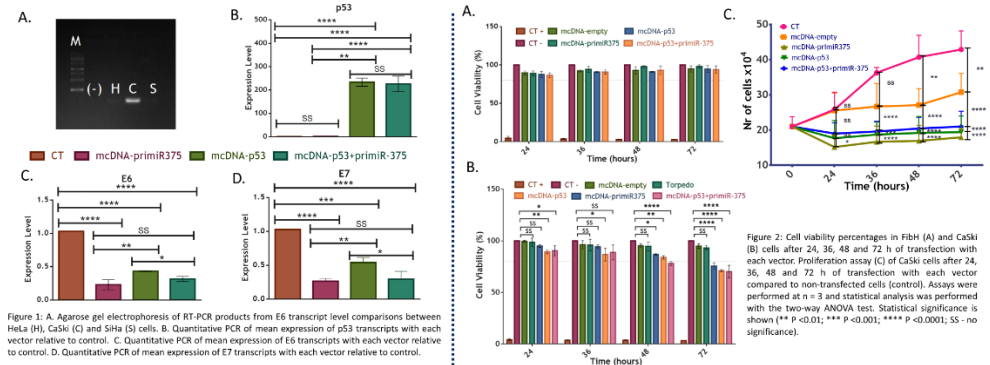
### Introduction

- Human papillomaviruses (HPVs) are double-stranded DNA viruses strongly associated with cervical cancer [1]. Most common high-risk types HPV16/18 encode E6 and E7 oncoproteins, which are responsible for p53 and pRB tumor suppressor proteins degradation and inactivation, respectively [2].
- Gene therapy has shown great potential for the treatment of various genetic diseases, and could be exploited for the potential treatment of cervical cancer using innovative minicircular DNA vectors (mcDNA), which are small non-viral gene expression vectors, to re-establish p53 and pRB levels.
- Also, microRNAs (miRNAs) have been identified as important regulators in tumorigenesis. For instance, miR-375 has demonstrated the ability to silence HPV E6/E7 oncoproteins [3].
- Thus, the present work aims the production and purification of three mcDNA vectors, encoding p53, pri-miR-375 or combining both p53+pri-miR-375 genes, to evaluate the biological effect by cervical cancer cells transfection.

### Materials and Methods



### Results



### Conclusions

- A PCR was made to compare HeLa, CaSki and SiHa cervical cancer cell lines, being observed that CaSki presents more E6 transcripts.
- In vitro studies showed a p53 increase coupled with E6 and E7 decrease in transcript levels, after 24 h of transfection with therapeutic vectors.
- Additional cytotoxicity and proliferation assays revealed no toxicity of our vectors towards Fibroblasts and a viability reduction in CaSki cells, more pronounced with p53 and p53+pri-miR-375 vectors, suggesting a potential therapeutic effect on the control of cervical cancer cell growth.

#### REFERENCES

- S. V. Graham, "The human papillomavirus replication cycle and its links to cancer progression: a comprehensive review" Clin. Sci., vol. 131, no. 17, pp. 2201-2221, 2017.
- A. M. Almeida, J. A. Queiroz, F. Sousa, and A. Sousa, "Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins" Drug Discov. Today, vol. 00, no. 00, pp. 1-14, 2015.
- H. M. Jang, S. I. Park, and E. K. Lee, "miR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6/E7" Mol. Cancer, vol. 13, no. 1, pp. 1-15, 2014.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported by funds from the Health Sciences Research Center (CICS-UBI) through National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (UIDB/00709/2019).