



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# **DNA minicircular multigénico com potencial ação terapêutica no cancro do colo do útero**

**Dalinda Isabel da Silva Eusébio**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Ciências Biomédicas**

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Ângela Sousa

Coorientadora: Prof. Doutora Fani Sousa

**Covilhã, outubro de 2018**



*Para as pessoas mais importantes da minha vida,  
os meus pais e a minha avó.*



# Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ângela Sousa, por todo o apoio e dedicação, pelos conselhos e conhecimento científico que partilhou comigo ao longo deste ano. À minha coorientadora, Professora Doutora Fani Sousa, por estar sempre disponível para ajudar e debater ideias. Ao Professor Doutor Cláudio Maia, pela disponibilidade que sempre demonstrou em ajudar nas dificuldades que foram surgindo na parte de engenharia genética incluída neste trabalho.

À Universidade da Beira Interior, particularmente ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde, por ter proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento deste projeto.

À Margarida, pelo privilégio que tive em trabalhar e aprender contigo. Obrigada por teres estado sempre disponível para esclarecer as minhas dúvidas e por todo o apoio. Obrigada pelas palavras de incentivo, por ouvires os meus desabafos de vez em quando, mas sobretudo pela tua amizade e paciência. À Joana Valente, pela sua boa-disposição logo pela manhã e também pela ajuda laboratorial que me proporcionou em certos momentos.

À Família Salinha: Carla, Jane, Marina, Rita, Marta, Diana e Jorge. Pelos incontáveis cafés, os inúmeros almoços, pelas longas conversas, pelas horas intermináveis que passámos juntos. Agradeço-vos principalmente pela vossa amizade e pelo apoio mútuo. Por todas as lágrimas e risos que partilhámos, sem vocês não teria sido a mesma coisa! Um agradecimento especial também à Catarina e à Déborah, pelas palavras amigáveis e de encorajamento.

Aos meus pais, sem vocês nada disto teria sido possível. Agradeço-vos do fundo do meu coração por terem feito com que este percurso académico fosse possível, por todos os vossos esforços e sacrifícios. Obrigada por todo o apoio e compreensão, por acreditarem sempre em mim. Aos meus dois maninhos, por sempre me fazerem esquecer por um bocadinho a agitação da minha vida. À minha avó, por sempre demonstrar o orgulho que tem em mim e por acreditar que consigo fazer o possível e o impossível para mudar o mundo.

Por último, agradeço-te a ti, João. Pelo amor incondicional, por estares sempre ao meu lado, por seres o meu melhor amigo nos bons e nos maus momentos.



## Resumo

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é o principal fator de risco para o cancro do colo do útero, uma vez que as oncoproteínas E6 e E7 comprometem a expressão ou a atividade das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb. Muitas abordagens terapêuticas têm sido consideradas ineficazes, existindo a necessidade de desenvolver novas estratégias como a terapia génica. O DNA minicircular (mcDNA) surge como um vetor inovador, que resulta de um processo de recombinação *in vivo*, no qual um plasmídeo parental (PP) leva à formação de um miniplasmídeo (mP) que contém as sequências procariotas, e um mcDNA que contém apenas a cassette de expressão eucariótica. O mcDNA apresenta uma elevada eficiência de transfecção devido ao seu tamanho reduzido, sendo também considerado uma terapia mais segura do que o DNA plasmídico. Assim, o presente trabalho tem como objetivo, numa primeira fase, produzir e purificar um vetor de mcDNA que codifica o gene p53 para aplicação em estudos *in vitro*. Com o intuito de isolar a isoforma superenrolada (sc) do mcDNA-p53, a partir de quantidades residuais de PP e impurezas bacterianas, foram explorados monolitos com ligandos de L-histidina e 1-benzil-L-histidina, assim como uma coluna cromatográfica de filtração em gel (Sephacryl S-1000 SF). A força iónica e o pH dos passos de ligação e eluição foram ajustados ao longo das estratégias de purificação. Os resultados indicaram que a filtração em gel foi a melhor abordagem para o isolamento da biomolécula de interesse, assegurando um grau de pureza superior e obtenção de maior quantidade de amostra. Posteriormente, foram realizados estudos de transfecção *in vitro* em células HeLa com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, tendo-se verificado a internalização celular de ambos os vetores. Para além disto, foi confirmada a transcrição do gene de interesse p53 e detetada a tradução na respetiva proteína alvo, assim como foi realizada a sua quantificação. Por último, de modo a avaliar a ação terapêutica do gene p53 codificado nestes vetores, foram realizados ensaios de proliferação celular, citotoxicidade e apoptose. De um modo geral, todos os estudos *in vitro* realizados sugeriram que o mcDNA-p53 apresenta resultados mais promissores, com potencial para ser utilizado numa nova estratégia terapêutica para o cancro do colo do útero. Numa segunda fase, o presente trabalho também teve como objetivo a construção de um vetor de mcDNA multigénico, com clonagem de dois genes terapêuticos no PP (gene p53 e gene pri-miRNA-375), visando uma potencial aplicação terapêutica combinada e mais eficaz no cancro do colo do útero.

## Palavras-chave

Cancro do colo do útero, DNA minicircular, gene p53, miRNA-375, plasmídeo parental.



# Abstract

Human Papillomavirus (HPV) is considered the main causative agent for the development of cervical cancer since its E6 and E7 oncoproteins compromise the expression or activity of p53 and pRb tumor suppressor proteins. Many cervical cancer therapeutic approaches have demonstrated to be ineffective, which emphasizes the need for new strategies such as gene therapy. Minicircle DNA (mcDNA) is a small eukaryotic expression vector that results from an *in vivo* site-specific recombination process, in which a parental plasmid (PP) leads to the formation of a miniplasmid (mP), carrying the undesired backbone sequences, and a mcDNA, carrying the therapeutic expression cassette. The mcDNA allows higher transfection efficiency due to its smaller size and it is a safer therapeutic approach than plasmid DNA. Therefore, the present work aims, in a first stage, to produce and purify a mcDNA encoding for p53 gene regarding future *in vitro* studies. L-histidine and 1-benzyl-L-histidine modified monoliths, as well the gel filtration column Sephacryl S-1000 SF, were explored to isolate the supercoiled (sc) mcDNA-p53 from residual amounts of parental plasmid and bacterial impurities. The ionic strength and pH of binding and elution steps were adjusted to enhance the purification performance. The chromatographic results suggest that gel filtration column presents a better approach for sc mcDNA-p53 isolation, ensuring a higher degree of purity and providing a larger quantity of recovered sample. Afterwards, HeLa cells were transfected with PP-p53 and mcDNA-p53 vectors. The cellular internalization and the transfection efficiency of both vectors were evaluated. In addition, both the transcription and translation of gene p53 was confirmed, following by the quantification of the target protein. Finally, the therapeutic effect of p53 gene encoded in both vectors was carry out through cell proliferation, cytotoxicity and apoptosis assays. Overall, these *in vitro* studies suggest that mcDNA-p53 is highly promising to be used as a new therapeutic strategy for cervical cancer in the future. Moreover, in a second stage, this work aims to construct a multigenic mcDNA vector encoding the p53 gene and pri-miRNA-375 gene, aiming to establish a potential combined therapeutic approach more effective for cervical cancer.

## Keywords

Cervical cancer, minicircle DNA, miRNA-375, parental plasmid, p53 gene.



# Índice

<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	1
1.1. Cancro do colo do útero .....	1
1.2. Vírus do Papiloma Humano .....	2
1.2.1. Biologia molecular do HPV .....	2
1.2.2. Ciclo de vida do HPV .....	3
1.2.3. Oncoproteínas E6 e E7 .....	4
1.3. Gene supressor de tumor p53 .....	7
1.4. miRNA-375 .....	8
1.5. Terapias baseadas em DNA .....	10
1.5.1. Vacinas de DNA .....	10
1.5.2. Terapia génica .....	12
1.5.3. Entrega génica .....	13
1.5.3.1. Vetores virais.....	13
1.5.3.2. Vetores não-virais .....	15
1.6. DNA plasmídico.....	16
1.6.1. Produção do DNA plasmídico .....	17
1.6.2. Purificação do DNA plasmídico .....	18
1.6.2.1. Cromatografia de exclusão molecular .....	19
1.6.2.2. Cromatografia de troca aniónica .....	19
1.6.2.3. Cromatografia de interação hidrofóbica .....	19
1.6.2.4. Cromatografia de afinidade .....	20
1.6.2.5. Monolitos.....	21
1.7. DNA minicircular .....	22
1.7.1. Produção do DNA minicircular.....	23
1.7.2. Purificação do DNA minicircular .....	24
<b>Capítulo 2 - Objetivos</b> .....	27
<b>Capítulo 3 - Materiais e Métodos</b> .....	29
3.1. Produção .....	29
3.1.1. Plasmídeo parental utilizado .....	29

3.1.2.	Condições do crescimento bacteriano .....	29
3.2.	Purificação .....	30
3.2.1.	Extração de PP-p53 .....	30
3.2.2.	Lise alcalina modificada .....	30
3.2.3.	Purificação do mcDNA-p53 através de cromatografia de afinidade .....	31
3.2.4.	Purificação do mcDNA-p53 através cromatografia de filtração em gel .....	31
3.2.5.	Eletroforese em gel de agarose .....	32
3.2.6.	Análise das amostras purificadas - Densitometria de bandas .....	32
3.3.	Estudos de transfecção <i>in vitro</i> .....	32
3.3.1.	Linhas celulares e condições de cultura .....	32
3.3.2.	Transfecção .....	32
3.3.3.	Internalização celular - <i>Live Cell Imaging</i> .....	33
3.3.4.	Eficiência de transfecção - Microscopia de Fluorescência .....	33
3.3.5.	Extração de RNA .....	34
3.3.6.	Síntese de cDNA .....	34
3.3.7.	RT-PCR .....	35
3.3.8.	Extração de proteína .....	35
3.3.9.	Quantificação de proteína .....	35
3.3.10.	SDS-PAGE e Western Blot .....	36
3.3.11.	Quantificação da proteína p53 - ensaio ELISA .....	37
3.3.12.	Ensaio de proliferação celular .....	38
3.3.13.	Avaliação da citotoxicidade celular - Ensaio com resazurina .....	38
3.3.14.	Avaliação da indução de apoptose - Kit de apoptose .....	38
3.4.	Construção do DNA minicircular multigénico .....	39
3.4.1.	Plasmídeos e enzimas de restrição utilizados .....	39
3.4.2.	Amplificação por PCR .....	39
3.4.3.	Digestões enzimáticas .....	40
3.4.4.	Etapa de clonagem .....	40
3.4.5.	Preparação de células <i>E. coli</i> competentes .....	41
3.4.6.	Transformação de células <i>E. coli</i> competentes .....	41
3.4.7.	Análise de colónias bacterianas através de PCR .....	42

3.4.8.	Estudo preliminar de transfecção com o vetor de PP multigénico .....	42
<b>Capítulo 4 - Resultados e Discussão</b> .....		<b>43</b>
4.1.	Purificação .....	43
4.1.1.	Purificação do mcDNA-p53 através de cromatografia de afinidade .....	43
4.1.1.1.	Monolito de 1-benzil-L-histidina .....	44
4.1.1.2.	Monolito de L-histidina .....	45
4.1.2.	Purificação do mcDNA-p53 através de cromatografia de filtração em gel .....	52
4.1.3.	Análise das amostras purificadas - Densitometria de bandas.....	53
4.2.	Estudos de transfecção <i>in vitro</i> .....	54
4.2.1.	Internalização celular - <i>Live Cell Imaging</i> .....	54
4.2.2.	Eficiência de transfecção - Microscopia de Fluorescência .....	55
4.2.3.	Deteção de transcritos do gene p53 - RT-PCR.....	57
4.2.4.	Deteção da proteína p53 - Western Blot .....	58
4.2.5.	Quantificação da proteína p53 - ensaio ELISA .....	59
4.2.6.	Ensaio de proliferação celular .....	60
4.2.7.	Avaliação da citotoxicidade celular - Ensaio com resazurina.....	62
4.2.8.	Avaliação da indução de apoptose - Kit de apoptose .....	63
4.3.	Construção do DNA minicircular multigénico .....	65
4.3.1.	Plasmídeos e enzimas de restrição utilizados .....	66
4.3.2.	Amplificações e digestões do vetor e fragmento .....	66
4.3.3.	Clonagem e transformação de células <i>E. coli</i> competentes .....	71
4.3.4.	Estudo preliminar de transfecção com o vetor de PP multigénico .....	73
<b>Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras</b> .....		<b>75</b>
<b>Capítulo 6 - Referências Bibliográficas</b> .....		<b>79</b>
ANEXO I .....		79
ANEXO II .....		89
ANEXO III .....		91
ANEXO IV .....		97



# Lista de Figuras

## Capítulo 1 - Introdução

Figura 1: Estimativa da mortalidade mundial associada ao cancro do colo do útero, por cada 100.000 mulheres, no ano de 2012 .....	1
Figura 2: Estrutura do genoma do Vírus do Papiloma Humano. ....	2
Figura 3: Representação esquemática da infeção das células basais do epitélio cervical mediada pelo HPV ao longo do tempo .....	4
Figura 4: Efeito da proteína p53 em condições fisiológicas e efeito da ligação da oncoproteína E6 à proteína p53 em situações de infeção por HPV de elevado risco. ....	5
Figura 5: Paragem do ciclo celular em G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> em condições fisiológicas e efeito da ligação da oncoproteína E7 à proteína pRb em situações de infeção por HPV de elevado risco .....	6
Figura 6: Estrutura da proteína p53 e frequência relativa de mutações <i>missense</i> encontradas em cancros. Estão identificados os 7 codões mais frequentemente mutados. ....	7
Figura 7: Representação esquemática da biogénese de miRNAs e mecanismos de atuação. ....	9
Figura 8: Representação esquemática da regulação que o miRNA-375 promove em células infetadas por HPV de elevado risco. ....	10
Figura 9: Número de ensaios clínicos de terapia génica aprovados mundialmente entre os anos de 1989-2017.. ....	12
Figura 10: Áreas de investigação dos ensaios clínicos de terapia génica aprovados até ao ano de 2017. ....	13
Figura 11: Representação esquemática das diferentes conformações do DNA plasmídico. ....	17
Figura 12: Representação esquemática das três etapas do processo biotecnológico.....	18
Figura 13: Representação esquemática da produção do mcDNA a partir do PP. ....	23

## Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Figura 14: Representação esquemática do plasmídeo parental clonado com o gene p53.. ....	29
Figura 15: Curva de calibração com a proteína padrão BSA (0,2 - 10 µg/µL). ....	36
Figura 16: Curva de calibração com a proteína p53 (50,00 - 0,78 U/mL). ....	37

## Capítulo 4 - Materiais e Métodos

Figura 17: Perfil cromatográfico da amostra de lisado injetada no monolito de 1-benzil-L-histidina, utilizando um gradiente com dois passos, e respetiva eletroforese em gel de agarose. ....	44
Figura 18: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos obtidos nos ensaios de <i>screening</i> , utilizando um gradiente decrescente com dois passos, começando com variação da percentagem de 100% - 70% do tampão de ligação. ....	46
Figura 19: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos obtidos nos ensaios de <i>screening</i> , utilizando um gradiente decrescente com dois passos, começando com variação da percentagem de 83% - 81% do tampão de ligação. ....	47
Figura 20: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos, utilizando um gradiente decrescente com três passos. ....	48
Figura 21: Perfil cromatográfico utilizando gradiente decrescente por passos e gradiente linear, e respetiva eletroforese em gel de agarose ....	49
Figura 22: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos, utilizando uma coluna convencional de L-histidina-agarose.. ....	50
Figura 23: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos obtidos nos três ensaios com amostras complexas de lisado. . . . .	50
Figura 24: Perfil cromatográfico da amostra de lisado injetada na coluna Sephacryl S-1000 SF e respetiva eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas ao longo do tempo. ....	52
Figura 25: Eletroforeses em gel de agarose de frações purificadas de mcDNA-p53 e respetivos picos gaussianos obtidos por densitometria de bandas. . . . .	53
Figura 26: Vista ortogonal de células HeLa transfectadas com os dois vetores de DNA marcados com FITC. . . . .	54
Figura 27: Imagens de microscopia confocal de células HeLa não-transfectadas (controlo) e transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 durante 1, 2 e 6 horas. . . . .	56
Figura 28: Intensidade de fluorescência média do FITC, a partir de imagens de microscopia confocal de células HeLa não-transfectadas e transfectadas durante 1, 2 e 6 horas com os dois vetores marcados.. . . .	56
Figura 29: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR para a deteção de transcritos do gene p53 em células HeLa, após 24 horas de transfecção. . . . .	57

Figura 30: Western Blot para deteção da proteína p53 e normalização com a proteína <i>housekeeping</i> $\beta$ -actina, após 36 e 48 horas de transfecção.....	58
Figura 31: Concentrações de proteína p53 (U/mL) em células controlo e células transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, após 36 horas de transfecção..	60
Figura 32: Ensaio de proliferação com células HeLa transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 durante 24, 36, 48 e 72 horas, em comparação com células não-transfectadas (controlo).	61
Figura 33: Percentagens de viabilidade celular em relação ao controlo negativo (células não-transfectadas) em células HeLa e em Fibroblastos, após transfecções com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 durante 24, 36, 48 e 72 horas..	62
Figura 34: Avaliação da indução da apoptose, após 48 horas de transfecção com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53.	64
Figura 35: Representação esquemática do vetor PP-p53 mutado e mapa de restrição das enzimas.	65
Figura 36: Sequências de reconhecimento das enzimas de restrição EcoRV e Scal.	66
Figura 37: Eletroforese em gel de agarose 0,6% das digestões sequenciais.	67
Figura 38: Eletroforese em gel de agarose 0,6% das várias condições testadas para a enzima Scal	68
Figura 39: Eletroforese em gel de agarose 0,6% da primeira digestão enzimática.	69
Figura 40: Eletroforese em gel de agarose 0,6% da primeira e segunda digestão enzimática.	69
Figura 41: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para a amplificação do fragmento pri-miRNA-375.	70
Figura 42: Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR para a amplificação do gene pri-miRNA-375 e do gene GFP.	71
Figura 43: Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR a partir de colónias isoladas: amplificação do gene p53 e amplificação do gene pri-miRNA-375..	72
Figura 44: Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de RT-PCR para a deteção de transcritos do gene p53 e dos oncogenes E6 e E7.	73
Figura 45: Imagens de microscopia confocal de células HeLa não-transfectadas (controlo) e transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, durante 36 horas.	74



# Lista de Tabelas

## Capítulo 1 - Introdução

Tabela 1: Genótipos do HPV classificados de acordo com o seu potencial oncogénico. ....	2
Tabela 2: Funções dos genes do Vírus do Papiloma Humano.....	3
Tabela 3: Vantagens das vacinas de DNA em comparação com as vacinas tradicionais.....	11
Tabela 4: Comparação das vantagens e desvantagens dos vários vetores virais utilizados na terapia génica. ....	14
Tabela 5: Comparação das vantagens e desvantagens dos vários métodos físicos. ....	15
Tabela 6: Comparação das vantagens e desvantagens dos vários métodos químicos.....	16

## Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Tabela 7: <i>Primers</i> utilizados para os genes GFP, pri-miRNA-375 e p53. ....	42
Tabela 8: <i>Primers</i> utilizados para os transcritos dos genes p53, E6 e E7. ....	42

## Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Tabela 9: Tempos de retenção de cada biomolécula isolada no monolito de L-histidina. ....	45
Tabela 10: Comparação entre a presença de PP-p53 e mcDNA-p53 no 1º pico cromatográfico, de acordo com as diferentes percentagens de equilíbrio testadas. ....	46
Tabela 11: Concentrações de proteína p53 (U/mL) em células HeLa não-transfectadas e transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, após 36 horas de transfecção, obtidas através do ensaio ELISA. ....	59



## Lista de Acrónimos

µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Celsius
BSA	Albumina do soro bovino
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO <sub>600nm</sub>	Densidade ótica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	Soro fetal bovino
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FW	<i>Forward</i>
g	Unidade de aceleração
gDNA	DNA genómico
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HRP	Enzima Horseradish Peroxidase
kDa	Quilo Daltons
Kpb	Quilo pares de bases
L	Litro
LB	<i>Luria-Bertani</i>
M	Molar
m/v	Massa/volume
mA	Miliamperes
mcDNA	DNA minicircular
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mP	Mini-plasmídeo

NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
oc	Circular aberta
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Probabilidade de significância
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldeído
pKa	Constante de dissociação ácida
PP	Plasmídeo Parental
pré-miRNA	MicroRNA precursor
pri-miRNA	MicroRNA primário
RISC	Complexo Silenciador Induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RV	<i>Reverse</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>
sc	Superenrolada
SDS	Dodecil Sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade enzimática
UV	Ultravioleta
V	Voltes
v/v	Volume/volume

# Lista de comunicações científicas

**Comunicação de poster** no 12º Simpósio Internacional “European Society of Biochemical Engineering Sciences” (ESBES), Lisboa (2018): Dalinda Eusébio, Ana M. Almeida, Joel Alves, Cláudio J. Maia, João A. Queiroz, Fani Sousa, Ângela Sousa. Recombinant p53-minicircular DNA: from vector construction to biopharmaceutical purification (Anexo I)

**Comunicação de poster** no XIII Simpósio Anual do CICS-UBI, Covilhã (2018): Dalinda Eusébio, Ana M. Almeida, Joel Alves, Cláudio J. Maia, João A. Queiroz, Fani Sousa, Ângela Sousa. Recombinant p53-minicircular DNA: biopharmaceutical purification and re-establishing of the p53 levels in cancer cells (Anexo II)



# Capítulo 1 - Introdução

## 1.1. Cancro do colo do útero

O cancro do colo do útero é o quarto cancro que mais afeta as mulheres em todo o mundo [1]. Estudos epidemiológicos identificaram quais os principais fatores de risco associados a este tipo de cancro, nomeadamente um baixo nível socioeconómico, falta de higiene pessoal, múltiplos parceiros sexuais, consumo de tabaco, insuficiência de nutrientes, fatores genéticos e principalmente infeções virais causadas pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) [2]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o último relatório emitido em 2012 sobre a prevalência global de infeções por HPV apontou para aproximadamente 630 milhões de casos, sendo que 520.000 destes casos foram diagnosticados com cancro do colo do útero que resultaram em aproximadamente 266.000 mortes (Figura 1). Cerca de 85% destes casos têm prevalência nos países em desenvolvimento, dado que apresentam recursos muito limitados para prevenir e tratar esta doença [3].

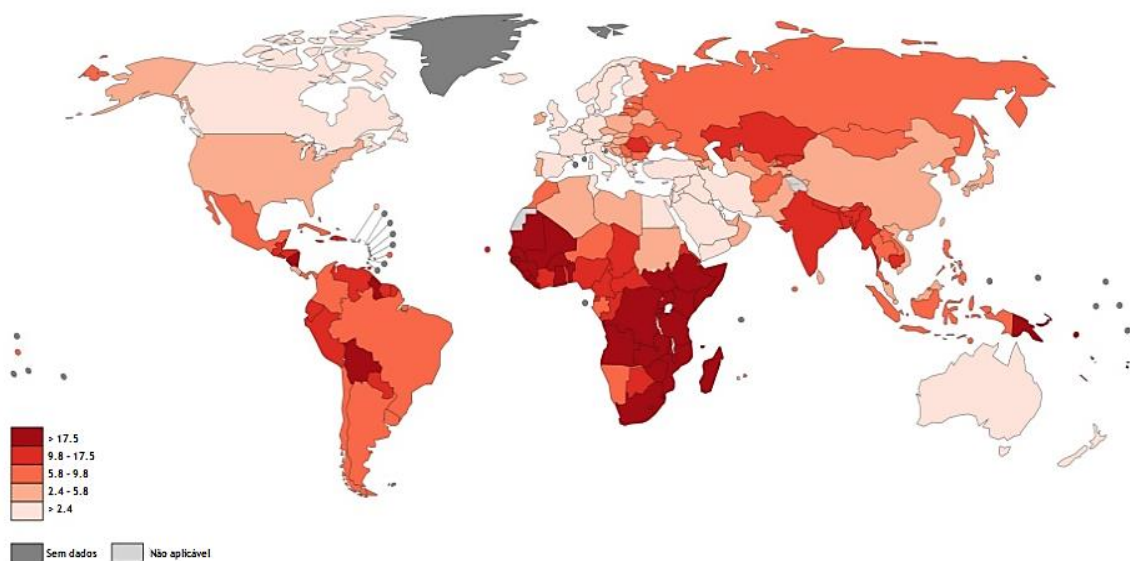


Figura 1: Estimativa da mortalidade mundial associada ao cancro do colo do útero, por cada 100.000 mulheres, no ano de 2012 (Adaptado de [4]).

## 1.2. Vírus do Papiloma Humano

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento do cancro do colo do útero e possui mais de 200 genótipos diferentes. Este vírus pertence à família *Papillomaviridae* e pode ser agrupado em cinco géneros diferentes (alfa, beta, gama, mu e nu), de acordo com as diferenças entre as sequências de DNA [5]. O género alfa-papilomavírus inclui os genótipos que são responsáveis por infeções ao nível das mucosas genitais, enquanto que os restantes géneros são caracterizados pela sua capacidade de infeção ao nível cutâneo [6].

Os diferentes genótipos que infetam as mucosas podem também ser classificados de acordo com o seu potencial oncogénico (Tabela 1). Os grupos de baixo risco dão origem a lesões benignas, como os condilomas, enquanto que os grupos de elevado risco são considerados oncogénicos e causam uma infeção persistente [2]. Na categoria de elevado risco, os genótipos mais comuns são o HPV-16 e o HPV-18, responsáveis por 71% dos casos totais de cancro do colo do útero [5]. Mais de 50% destes casos estão associados apenas ao HPV-16, sendo este genótipo considerado o mais prevalente [3].

Tabela 1: Genótipos do HPV classificados de acordo com o seu potencial oncogénico (Adaptado de [3]).

<b>HPV de baixo risco</b>	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
<b>HPV de elevado risco</b>	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82

### 1.2.1. Biologia molecular do HPV

O genoma do HPV é constituído por uma dupla cadeia de DNA circular com cerca de 8.000 pares de bases, codificando um total de 8 genes. Este genoma apresenta tropismo para as células epiteliais, infetando a pele e mucosas, e está dividido em três regiões: a região precoce (E), a região tardia (L) e a região longa de controlo (LCR) (Figura 2) [5].

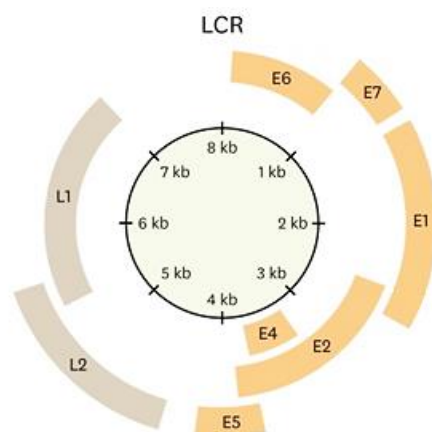


Figura 2: Estrutura do genoma do Vírus do Papiloma Humano (Adaptado de [7]).

A região precoce inclui os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 que se encontram envolvidos na replicação, regulação da transcrição e oncogénese. A região tardia codifica as proteínas estruturais L1 e L2 que constituem a cápside que protege o genoma viral. A região longa de controlo é uma região reguladora não codificante que contém uma sequência promotora, assim como *enhancers* e sequências silenciadoras necessárias para a replicação e transcrição viral (Tabela 2). O tamanho e a composição nucleotídica desta região varia consideravelmente entre diferentes genótipos do HPV [5].

Tabela 2: Funções dos genes do Vírus do Papiloma Humano (Adaptado de [5]).

REGIÃO		GENE	FUNÇÃO
Codificante	Precoce	E1	Permite a replicação do DNA viral
		E2	Regula a transcrição viral
		E4	Contribui para a deformação de células infetadas (coilocitose)
		E5	Inibição da apoptose e interação com fatores de crescimento
		E6	Induz a degradação da proteína supressora de tumor p53
		E7	Induz a degradação da proteína supressora de tumor pRb
	Tardia	L1	Codifica a proteína principal da cápside viral (55 kDa)
		L2	Codifica a proteína secundária da cápside viral (70 kDa)
Não codificante	Longa de Controlo	LCR	Envolvido na regulação da replicação e transcrição viral

### 1.2.2. Ciclo de vida do HPV

A infeção por HPV é iniciada na zona de transformação do epitélio do colo do útero, através de possíveis micro-lesões que expõem as células da camada basal à entrada do vírus. Esta zona de transformação encontra-se localizada entre o epitélio pavimentoso e o epitélio colunar. Após a entrada do vírus na célula hospedeira é iniciado o ciclo de replicação do vírus, que se encontra estreitamente associado ao ciclo de diferenciação das células epiteliais infetadas. Isto é, o DNA do vírus é replicado apenas quando o DNA das células infetadas é replicado [5]. Em infeções benignas, a manutenção do genoma viral ocorre num estado epissomal, sendo que em infeções malignas ocorre frequentemente a integração do DNA viral no genoma humano [8].

Os genes E1 e E2 são necessários para a manutenção do genoma viral nas células hospedeiras, uma vez que estes são responsáveis pelo início da replicação e pelo recrutamento da DNA polimerase celular necessária para este processo. Por sua vez, as oncoproteínas E6 e E7 atuam como estimuladores da proliferação, promovendo o aumento do número de células infectadas. Como consequência, a sobre-expressão dos genes virais leva à transformação das células infectadas em células malignas [5].

A carcinogênese é um processo complexo com várias etapas, não só porque os genes virais têm várias funções na transformação de células normais em células cancerígenas, mas também porque o tecido epitelial normal vai sofrendo modificações ao longo do tempo, evoluindo para neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) de vários graus, carcinoma *in situ* (CIS), e levando por último ao desenvolvimento do cancro do colo do útero (Figura 3) [5].

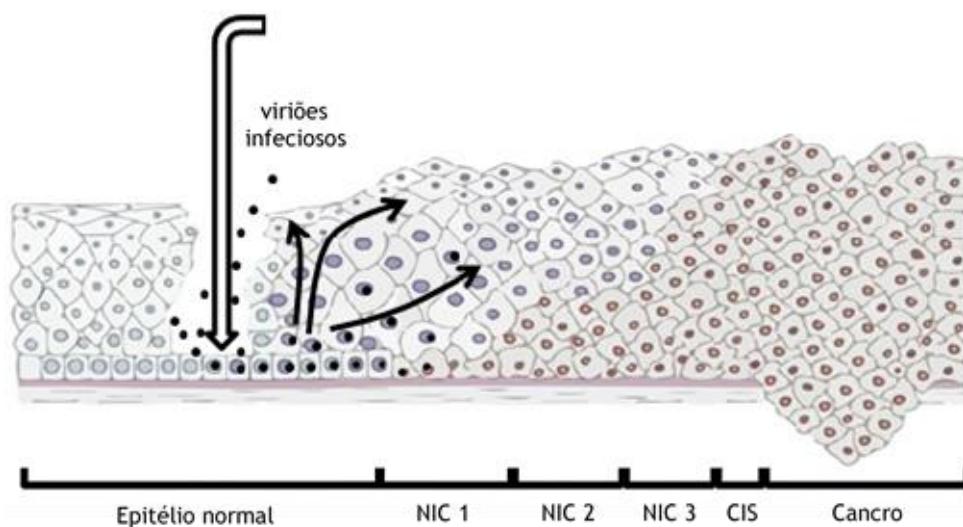


Figura 3: Representação esquemática da infecção das células basais do epitélio cervical mediada pelo HPV ao longo do tempo (Adaptado de [5]).

### 1.2.3. Oncoproteínas E6 e E7

Os genes E6 e E7 do HPV, ao serem transcritos pela célula eucariótica infectada, vão dar origem às respectivas oncoproteínas que possuem um papel importante na progressão do cancro do colo do útero [5].

A oncoproteína E6 tem a capacidade de alterar a proliferação celular através da ação que exerce sobre a proteína supressora de tumor p53. Esta oncoproteína forma um complexo com a proteína E6AP (*E6-associated protein*), adquirindo afinidade para se ligar à p53 e marcando-a para degradação através de ubiquitinação, resultando na perda de atividade da p53 nas células infectadas. Foi demonstrado que a oncoproteína E6 codificada por genótipos de HPV de elevado risco (HPV-16 e HPV-18) apresenta uma maior afinidade pela p53 e acelera a sua degradação, quando comparada com a mesma oncoproteína codificada por genótipos de HPV de baixo risco [9].

Em condições fisiológicas, a proteína p53 tem a capacidade de detectar danos no DNA celular, ativando o gene WAF1/Cip1 que consiste num inibidor de cinases dependentes de ciclina (CDKs), essenciais para a progressão do ciclo celular. Como consequência, existe uma paragem do ciclo na fase G<sub>1</sub> de modo a permitir a reparação do DNA e a manutenção da integridade do genoma, antes da progressão do ciclo para a fase S e da síntese de DNA. Em situações de infeção por HPV de elevado risco, o complexo E6-p53 promove a degradação da proteína p53 através de uma via proteolítica dependente de ubiquitina. Deste modo, os níveis de p53 são baixos e as CDKs ficam ativas, estimulando a progressão do ciclo celular de forma descontrolada e provocando a acumulação de mutações genéticas (Figura 4) [9].

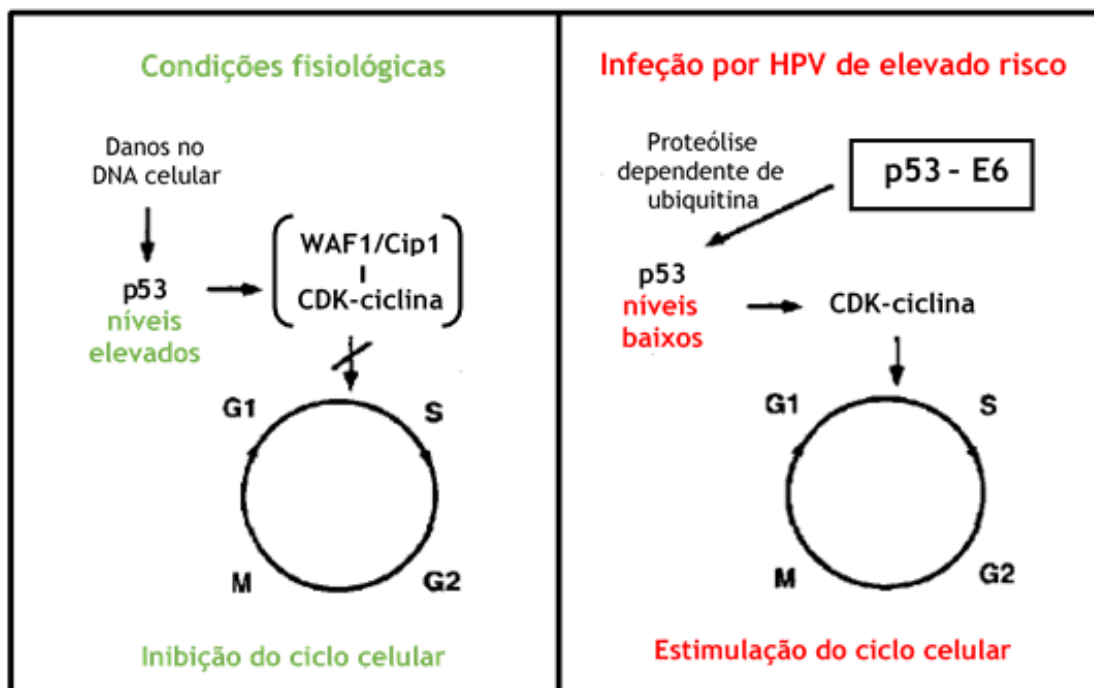


Figura 4: Efeito da proteína p53 em condições fisiológicas e efeito da ligação da oncoproteína E6 à proteína p53 em situações de infeção por HPV de elevado risco (Adaptado de [9]).

Por outro lado, a oncoproteína E7 tem afinidade para a proteína do retinoblastoma (pRb), impedindo assim a atividade desta proteína supressora de tumor, e consequentemente, ativando genes envolvidos na progressão do ciclo celular [6]. Foi demonstrado que a oncoproteína E7 codificada por genótipos de HPV de elevado risco (HPV-16 e HPV-18) apresenta uma maior afinidade pela proteína pRb, quando comparada com a mesma oncoproteína codificada por genótipos de HPV de baixo risco [9].

Em condições fisiológicas e em momentos específicos do ciclo celular (fase  $G_0/G_1$ ), a proteína pRb forma complexos com fatores de transcrição da família E2F. Estes complexos regulam negativamente o crescimento celular através da supressão da transcrição de genes dependentes de E2F. Estes genes codificam proteínas envolvidas na síntese de DNA, como a timidina cinase, a di-hidrofolato redutase e a DNA polimerase, assim como os proto-oncogenes *c-myc* e *N-myc*. À medida que as células progridem para a fase S, os complexos pRb-E2F dissociam-se e os fatores de transcrição E2F ficam disponíveis para estimular a transcrição de genes dependentes de E2F que permitem a replicação do DNA. Em situações de infecção por HPV de elevado risco, a oncoproteína E7 altera este mecanismo de regulação através da sua ligação à proteína pRb. Deste modo, a pRb perde a capacidade de regular os fatores de transcrição E2F, e a libertação destes fatores vai estimular a transcrição dos genes dependentes de E2F necessários para a replicação do DNA, resultando na progressão do ciclo celular (Figura 5) [9].

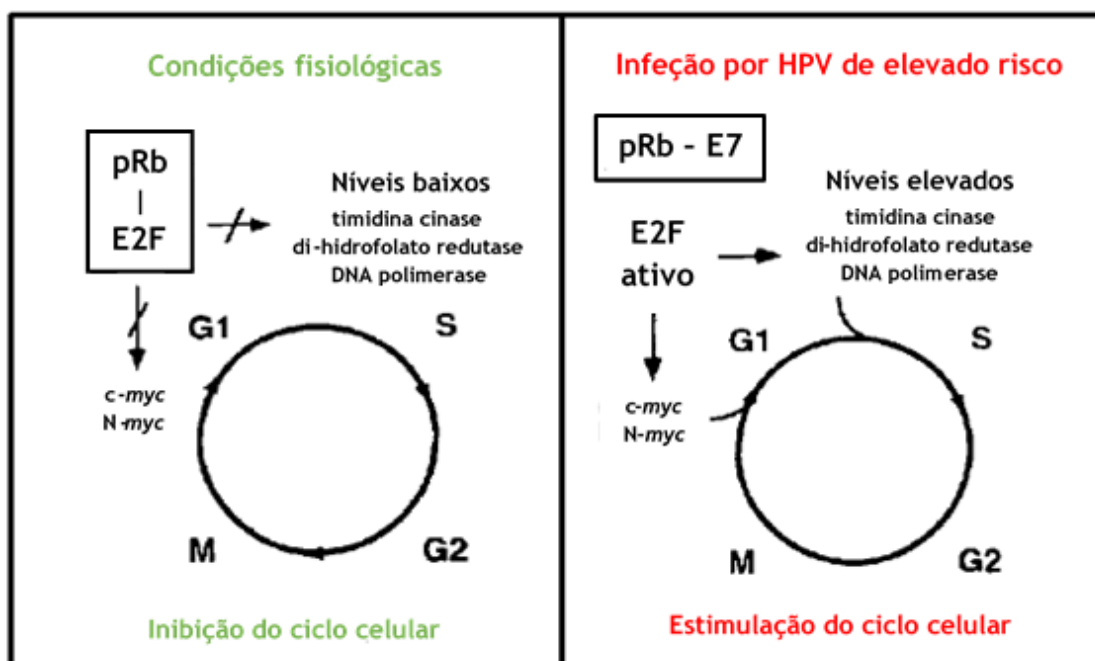


Figura 5: Paragem do ciclo celular em  $G_0/G_1$  em condições fisiológicas e efeito da ligação da oncoproteína E7 à proteína pRb em situações de infecção por HPV de elevado risco (Adaptado de [9]).

A ação conjugada destas oncoproteínas resulta na desregulação do ciclo celular, diminuição da reparação do DNA e inibição da apoptose. Desta forma, as oncoproteínas E6 e E7 promovem a proliferação celular descontrolada, resultando no aumento do número de células infetadas com fenótipo maligno [5].

### 1.3. Gene supressor de tumor p53

O gene p53 encontra-se localizado no cromossoma 17p13.1 e codifica a proteína supressora de tumor p53. Esta é uma fosfoproteína nuclear constituída por 393 resíduos de aminoácidos e que possui 5 domínios estruturais, nomeadamente um domínio de ativação transcricional seguido de um domínio conservado rico em prolina, um domínio central de ligação ao DNA, um domínio de oligomerização e um domínio de regulação da ligação ao DNA (Figura 6) [10].

A proteína p53 atua como fator de transcrição, ligando-se a sequências específicas de DNA. Esta é considerada a “guardiã do genoma” uma vez que preserva a integridade genómica através de mecanismos que incluem a paragem do ciclo celular para a reparação de DNA ou a indução de senescência e/ou apoptose em células que foram irreversivelmente danificadas [10].

As mutações no gene p53 são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tipos de cancro. Estas mutações ocorrem principalmente no domínio de ligação ao DNA, sendo que a maioria são mutações *missense* que resultam de substituições de aminoácidos (Figura 6) [11]. Estas traduzem-se numa perda de função, levando à acumulação de proteína p53 disfuncional e tornando as células incapazes de controlar o seu crescimento e a sua morte, resultando, por fim, na imortalização celular e desenvolvimento de tumor [12].

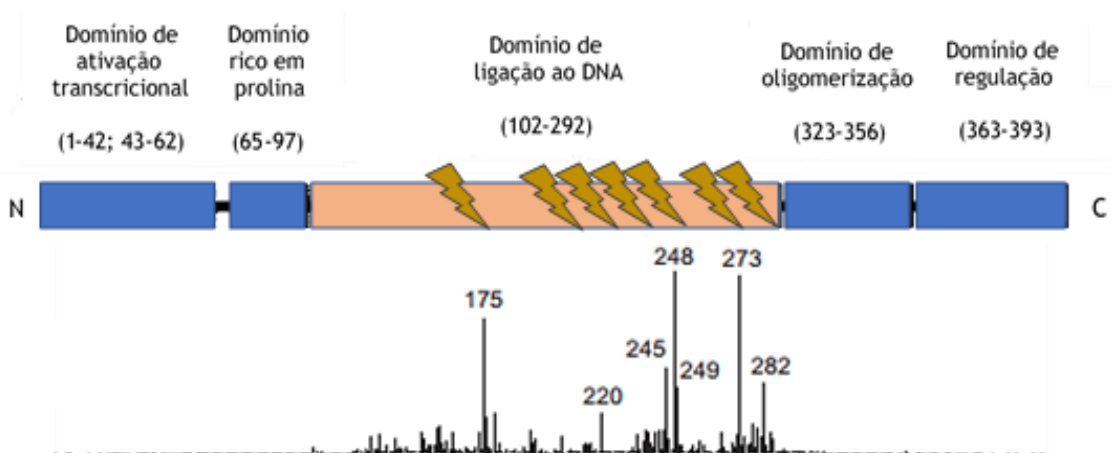


Figura 6: Estrutura da proteína p53 e frequência relativa de mutações *missense* encontradas em cancros. Estão identificados os 7 codões mais frequentemente mutados (Adaptado de [13]).

Em condições fisiológicas normais, a proteína p53 é mantida em níveis baixos, sendo degradada principalmente por ubiquitinas ligases E3, como por exemplo a proteína MDM2 (*murine double minute 2*). Quando as células são expostas a um stress genotóxico, a p53 é modificada pós-transcricionalmente através de processos de fosforilação e acetilação, tornando-se estável e adquirindo a capacidade de induzir a paragem do ciclo celular e/ou morte celular. Por exemplo, danos no DNA promovem a fosforilação da p53, bloqueando a degradação mediada pela MDM2 [14].

Como existe uma perda de função da p53 na maioria dos cancros, reverter este processo tem sido visto como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos. Muitos métodos têm sido investigados no sentido de restaurar esta função, nomeadamente a eliminação da p53 mutada, a reversão da forma mutada à forma não mutada, a inibição de reguladores negativos como a proteína MDM2 e terapias génicas que envolvem a entrega de cópias funcionais do gene p53 às células cancerígenas [14]. A eliminação de uma proteína mutada pode ser realizada através do silenciamento génico promovido, por exemplo, pela aplicação de microRNAs específicos [15].

#### **1.4. miRNA-375**

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não-codificante de cadeia simples, com aproximadamente 21 nucleótidos. Os miRNAs não sofrem tradução e são responsáveis pela regulação pós-transcricional de RNAs mensageiros (mRNAs) [16]. A biogénese destas moléculas é iniciada com a transcrição do gene do miRNA pela RNA polimerase II, dando origem a um miRNA primário (pri-miRNA). Ainda no núcleo, uma das extremidades é clivada pela enzima Drosha, originando um miRNA precursor (pré-miRNA) que é transportado para o citoplasma, local onde a outra extremidade é clivada pela enzima Dicer. Este processo origina uma molécula de miRNA de cadeia dupla que se associa com o complexo silenciador induzido por RNA (RISC), no qual estas duas cadeias de RNA são separadas. Uma das cadeias permanece associada com o complexo RISC e constitui o miRNA maduro, sendo que a outra cadeia sofre degradação. Posteriormente, este complexo associado com o miRNA maduro irá funcionar como inibidor de proteínas alvo, atuando através de dois mecanismos: degradação do transcrito ou inibição da tradução do transcrito, dependendo do nível de complementaridade entre as bases do miRNA maduro e do mRNA específico (Figura 7) [17, 18].

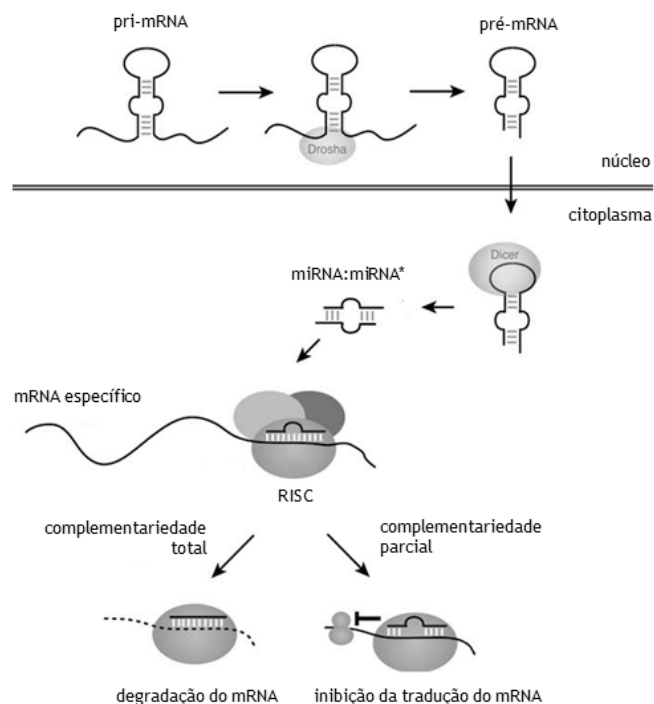


Figura 7: Representação esquemática da biogênese de miRNAs e mecanismos de atuação (Adaptado de [18]).

Os miRNAs podem ser classificados como oncogenes ou como supressores de tumor, participando de forma positiva ou negativa em diversos processos de proliferação, metabolismo, apoptose e diferenciação celular de vários câncros [19].

O miRNA-375 encontra-se significativamente diminuído em vários tipos de cancro, quando comparado com células normais. Sabe-se que o miRNA-375 tem uma ação direta em diversos genes relacionados com o cancro, funcionando como um supressor de tumor [20].

Alguns estudos identificaram o oncogene SP1 (*specificity protein 1*) como sendo um alvo do miRNA-375. Este oncogene é responsável pela proliferação, migração e invasão celular, participando na progressão do cancro do colo do útero. Foi demonstrado que o aumento dos níveis de miRNA-375 resulta na diminuição da expressão da proteína SP1. Assim, o miRNA-375 inibe a proliferação celular através do bloqueio do ciclo celular na fase G<sub>1</sub>, através da repressão do fator de transcrição SP1 [19].

O oncogene IGF-IR (*insulin-like growth factor-1 receptor*) também foi identificado como sendo um alvo do miRNA-375, associado com o cancro do colo do útero. Este é um recetor transmembranar que tem a capacidade de estimular a proliferação celular e induzir a resistência à apoptose. Verificou-se que o aumento dos níveis de miRNA-375 resulta na diminuição da expressão do fator de transcrição IGF-IR, inibindo a proliferação celular e promovendo a apoptose [21].

Por outro lado, foi demonstrado que o miRNA-375 tem a capacidade de inibir a expressão das oncoproteínas E6 e E7 em células infectadas por HPV de elevado risco, assim como a expressão da proteína E6AP, levando conseqüentemente ao aumento dos níveis das proteínas p53 e pRb (Figura 8). Assim, o aumento dos níveis de miRNA-375 pode reestabelecer os níveis normais dos supressores de tumor nas células epiteliais, inibindo o desenvolvimento e progressão do cancro do colo do útero [22].

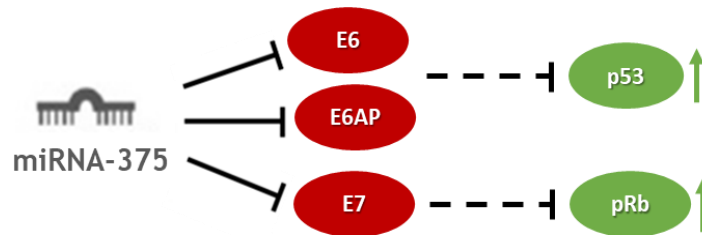


Figura 8: Representação esquemática da regulação que o miRNA-375 promove em células infectadas por HPV de elevado risco (Adaptado de [22]).

Em suma, de acordo com os estudos e evidências referidas anteriormente, o miRNA-375 pode ser considerado um supressor de tumor com potencial efeito terapêutico contra o cancro do colo do útero.

## 1.5. Terapias baseadas em DNA

O cancro continua a ser uma das doenças que causa mais mortes em todo o mundo. Os tratamentos atuais incluem cirurgia, radiação e quimioterapia. No entanto, estes tratamentos apresentam uma taxa de sucesso muito limitada, resultam apenas em algumas situações contra tumores localizados em estágio inicial, e raramente funcionam em estágios mais avançados ou em caso de formação de metástases. Como estes tratamentos são muito invasivos, também causam danos nos tecidos saudáveis e provocam efeitos secundários [23]. Desta forma, é fundamental o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que induzam uma proteção duradoura e que eliminem especificamente as células cancerígenas, como são exemplo as vacinas de DNA e a terapia génica.

### 1.5.1. Vacinas de DNA

As vacinas convencionais têm como objetivo a prevenção de doenças infecciosas, estimulando o sistema imunitário a produzir anticorpos neutralizantes contra antígenos específicos, através da imunidade humoral [23]. Atualmente, existem no mercado vacinas profiláticas constituídas por partículas da cápside do HPV, preparadas pela expressão recombinante da proteína estrutural L1 [24]. No entanto, este tipo de vacinas tem como finalidade a prevenção e não

tem qualquer efeito em infecções estáveis pré-existentes, uma vez que após a integração do HPV no genoma das células, as proteínas estruturais deixam de ser expressas e os anticorpos neutralizantes deixam de ser efetivos no reconhecimento das células infetadas [7]. Além disso, estas vacinas convencionais apenas garantem uma proteção parcial contra alguns genótipos do HPV e possuem limitações ao nível do elevado custo de produção e distribuição [25].

Considerando a necessidade de uma intervenção terapêutica direcionada para o cancro proveniente de uma infecção viral, vacinas terapêuticas que controlem uma infecção já existente estão atualmente sob investigação [24]. As vacinas de DNA surgem como uma potencial abordagem, tendo já sido usadas com sucesso em modelos cancerígenos de infecções virais, como é o caso de cancros associados ao HPV, estando alguns ensaios clínicos a decorrer. Estas vacinas contêm genes que codificam antígenos de interesse e têm como objetivo ativar o sistema imunitário, levando não só à produção de anticorpos de memória (imunidade humoral) mas principalmente à ativação de linfócitos T citotóxicos que vão permitir a eliminação das células infetadas (imunidade celular) [23]. No caso das vacinas de DNA contra o cancro do colo do útero, a expressão dos antígenos tumorais E6 e E7 (que estão presentes apenas nas células infetadas), vai desencadear uma resposta imunitária terapêutica e direcionada somente às células cancerígenas [7].

Estas vacinas de DNA possuem vantagens relativamente às vacinas convencionais, principalmente no que diz respeito à capacidade de induzir tanto respostas humorais como respostas celulares. Apresentam também uma produção rápida e menos dispendiosa (Tabela 3) [26].

Tabela 3: Vantagens das vacinas de DNA em comparação com as vacinas tradicionais (Adaptado de [26]).

<b>Fabrico</b>	Fabricação rápida, uma vez que o DNA pode ser rapidamente isolado e clonado.
<b>Produção</b>	Menor custo de produção, sendo possível produzir em larga escala.
<b>Transporte</b>	Fácil transporte e armazenamento, uma vez que são mais termoestáveis.
<b>Imunidade</b>	Capacidade de induzir respostas humorais e respostas celulares.

No entanto, as vacinas de DNA também apresentam algumas limitações, como por exemplo o baixo nível de eficiência demonstrado em ensaios clínicos quando administradas sem qualquer vetor de entrega (DNA *naked*) e a necessidade de múltiplas doses [27].

### 1.5.2. Terapia génica

A terapia génica surge como uma estratégia promissora para tratar doenças adquiridas e/ou desordens genéticas, sendo definida como a transferência de ácidos nucleicos exógenos para as células hospedeiras. O principal objetivo da terapia génica consiste numa entrega eficaz da nova informação genética a células específicas, de modo a corrigir uma perda de função causada por uma mutação, como é o caso das doenças monogénicas, ou introduzir funções adicionais para tratar ou evitar a progressão de uma doença, como o cancro. Assim, dependendo do objetivo da terapia, a subsequente expressão transgénica pode restaurar os processos celulares normais ou induzir novas respostas celulares [28, 29].

A terapia génica pode ser realizada em linhas de células somáticas ou linhas de células germinativas, sendo que a diferença entre estas duas abordagens consiste no facto de existir uma transmissão à descendência do material genético introduzido nas células germinativas. Algumas questões éticas têm-se levantado relativamente à segurança da sua utilização em humanos, dado que existe risco de ocorrer modificações genéticas incontrolláveis, que poderão também ser transmitidas à descendência. Devido a estas preocupações, atualmente a legislação permite o uso da terapia génica apenas em células somáticas [30]. Até ao ano de 2017, mais de 2400 ensaios clínicos de terapia génica foram aprovados em todo o mundo (Figura 9).

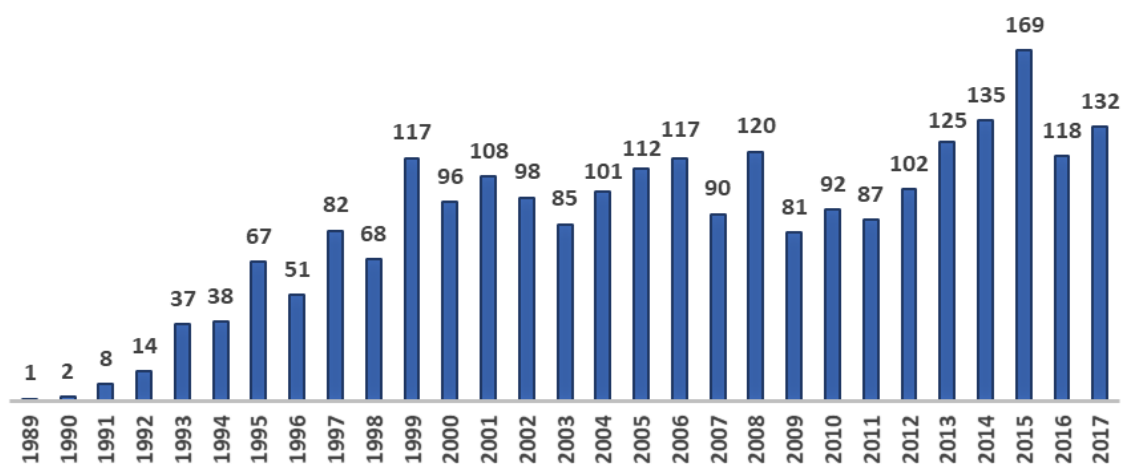


Figura 9: Número de ensaios clínicos de terapia génica aprovados mundialmente entre os anos de 1989-2017 (Adaptado de [31]).

O cancro continua a ser a principal área de investigação dos ensaios clínicos de terapia génica (65%), seguido das doenças monogénicas (11.1%), doenças infecciosas (7%) e doenças cardiovasculares (6.9%) (Figura 10).

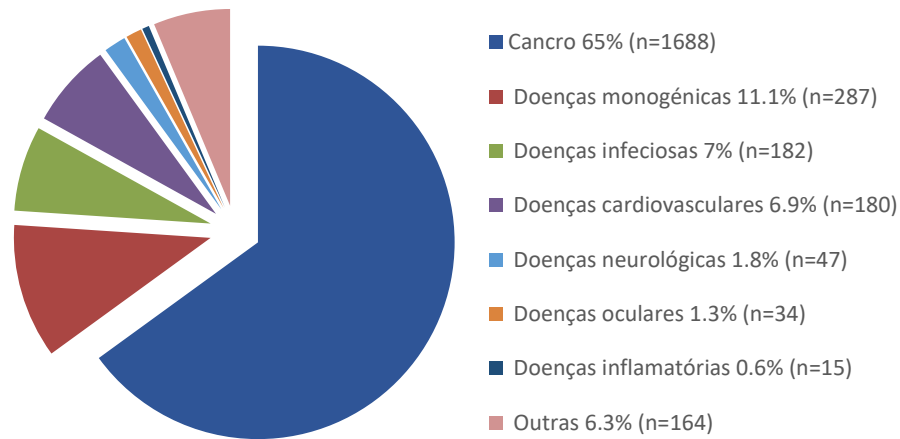


Figura 10: Áreas de investigação dos ensaios clínicos de terapia génica aprovados até ao ano de 2017 (Adaptado de [31]).

De forma a aumentar a sua eficiência, a terapia génica requer a utilização de sistemas apropriados que promovam uma entrega segura e eficaz dos ácidos nucleicos, nomeadamente vetores virais ou vetores não-virais [32].

### 1.5.3. Entrega génica

Os sistemas de entrega têm como finalidade ultrapassar barreiras e complexos celulares, de modo a conseguirem entregar a informação genética no núcleo das células-alvo [33]. Para tal, os sistemas devem resistir à degradação pelas nucleases extracelulares, mediar a sua entrada através da membrana celular, conseguirem escapar da degradação promovida dentro de vesículas endossomais, prevenir a sua degradação através de nucleases citoplasmáticas e, por último, ultrapassar a membrana nuclear para que o gene terapêutico possa ser transcrito dentro do núcleo da célula. Além disso, o vetor utilizado também necessita de ser biocompatível e não desencadear respostas imunitárias adversas [34, 35].

Cerca de 70% dos ensaios clínicos realizados utilizaram vetores virais para a entrega de ácidos nucleicos devido à sua elevada capacidade de invasão celular, apesar de apresentarem muitas limitações associadas com a biossegurança, imunogenicidade e dificuldade na produção. Por outro lado, os vetores não-virais apresentam vantagens, particularmente no que diz respeito à biossegurança. São também mais fáceis de sintetizar e possuem a capacidade de transferir genes de grande dimensão, apesar de apresentarem menor eficiência de transfecção [35].

#### 1.5.3.1. Vetores virais

Os vírus são frequentemente utilizados como vetores de entrega génica, dado que possuem propriedades biológicas que lhes permitem facilmente reconhecer e entrar nas células, migrar do citosol para o núcleo e expressar o seu material genético na célula hospedeira [36].

Contudo, é necessário modificar geneticamente estes vetores de modo a reduzir a sua toxicidade, realizando-se a remoção da maioria de sequências patogénicas possíveis [29]. As estruturas que permitem a invasão celular são mantidas e realiza-se a introdução dos genes terapêuticos. Devido ao ciclo de vida que os vírus possuem, estes vetores apresentam uma elevada eficiência de transfecção *in vivo* [32]. No entanto apresentam algumas desvantagens, principalmente ao nível da biossegurança, como o facto de poderem desencadear respostas imunitárias severas e a possibilidade de ocorrer mutagénese insercional. A produção deste tipo de vetores em larga escala é bastante difícil e muito dispendiosa, além de apresentarem uma limitação ao nível do tamanho do gene terapêutico que é inserido [32, 37].

Os principais vírus utilizados como vetores virais na terapia génica são adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, lentivírus e vírus herpes-simplex, sendo que cada um destes apresenta diferentes vantagens e desvantagens (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação das vantagens e desvantagens dos vários vetores virais utilizados na terapia génica (Adaptado de [32, 37, 38]).

<b>VETOR</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>
<b>Adenovírus</b>	Elevada eficiência de transfecção Infeta células proliferativas e não-proliferativas Infecta vários tipos de células Muito usado em ensaios clínicos	Tamanho máximo do gene: 4-5 kb Elevada imunogenicidade Difícil de produzir Expressão transiente
<b>Vírus adeno-associados</b>	Infeta vários tipos de células Expressão prolongada Baixa imunogenicidade	Tamanho máximo do gene: 5 kb Difícil de produzir Ensaios clínicos limitados Problemas de biossegurança: possibilidade de mutagénese insercional
<b>Retrovírus</b>	Tamanho máximo do gene: 9-12 kb Elevada eficiência de transfecção Infecta vários tipos de células Expressão prolongada Baixa imunogenicidade Muito usado em ensaios clínicos	Apenas infeta células proliferativas Difícil de produzir Problemas de biossegurança: possibilidade de mutagénese insercional
<b>Lentivírus</b>	Infeta células proliferativas e não-proliferativas Infeta células estaminais hematopoiéticas Expressão prolongada	Tamanho máximo do gene: 8 kb Muito difícil produzir e armazenar Ensaios clínicos limitados
<b>Vírus herpes-simplex</b>	Tamanho máximo do gene: 40-50 kb Infeta células neuronais	Expressão transiente

### 1.5.3.2. Vetores não-virais

Os vetores não-virais têm a potencialidade de ultrapassar algumas das limitações dos vetores virais, particularmente no que diz respeito à biossegurança. A sua utilização tem ganho grande destaque nos últimos anos devido à capacidade de transferir genes de grande dimensão, baixa toxicidade para as células e fácil produção. A entrega através destes sistemas pode ser realizada por métodos físicos ou químicos [28, 35].

De forma geral, os métodos físicos consistem numa entrega de DNA *naked*, sem a utilização de transportadores, usando forças físicas que enfraquecem temporariamente a membrana celular, de modo a torná-la mais permeável e permitir a entrada do material genético nas células através de difusão [32]. No entanto, estes métodos apresentam uma baixa eficiência de transfecção, o que impõe uma limitação à sua utilização em larga escala (Tabela 5) [28].

Tabela 5: Comparação das vantagens e desvantagens dos vários métodos físicos (Adaptado de [28, 39, 40]).

MÉTODOS FÍSICOS	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Microinjeção	Simple, económico, efetivo, reprodutível, método não tóxico e com capacidade de transferir DNA de grande tamanho	Não é adequado para transfectar um grande número de células
Injeção por agulha	Simple e seguro	Baixa eficiência, uma vez que o DNA está sujeito a ser rapidamente degradado
Biobalística	Simple e seguro	Danifica os tecidos em algumas aplicações
Eletroporação	Seguro, bastante efetivo, reprodutível e capacidade de transferir DNA de grande tamanho	Necessária intervenção cirúrgica para transferir ácidos nucleicos para órgãos internos; a estabilidade do DNA genómico pode ser afetada pela voltagem
Ultrassom	Seguro, não invasivo, capacidade de transferir ácidos nucleicos para órgãos internos sem a necessidade de intervenção cirúrgica e potencial para atravessar a barreira hematoencefálica	Baixa eficiência <i>in vivo</i>
Entrega hidrodinâmica	Simple, reprodutível, efetivo e muito utilizado em células hepáticas	Necessária uma grande quantidade de volume, restrição da sua aplicação clínica
Massagem mecânica	Simple e seguro	Baixa eficiência e apenas foi utilizado com sucesso em células hepáticas

Por sua vez, os métodos químicos realizam a entrega gênica pela utilização de transportadores que podem ser preparados através de várias reações químicas. Estes podem ter vários objetivos isolados ou conjugados, nomeadamente mascarar as cargas negativas dos ácidos nucleicos, possuir biomoléculas que facilitem a atração e passagem pela membrana celular, comprimir as biomoléculas de modo a torná-las mais pequenas, proteger da ação de nucleases, promover um direcionamento para células específicas, desintegração dos transportadores apenas no citosol e libertação controlada no tecido específico (Tabela 6) [32, 40]. Assim, a conjugação destes transportadores com o DNA *naked*, como o DNA plasmídico, promove um aumento da eficiência das estratégias de terapia gênica.

Tabela 6: Comparação das vantagens e desvantagens dos vários métodos químicos (Adaptado de [28, 39]).

MÉTODOS QUÍMICOS	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Lípidos catiónicos	Fáceis de preparar, baixo custo, elevada eficiência <i>in vitro</i>	Toxicidade, baixa eficiência <i>in vivo</i>
Polímeros catiónicos	Fáceis de preparar, baixo custo, elevada eficiência	Toxicidade, alguns polímeros não são biodegradáveis
Híbridos lípidos-polímeros	Baixa toxicidade	Baixa eficiência <i>in vivo</i>

## 1.6. DNA plasmídico

Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA circular extracromossomal, capazes de realizar uma replicação semi-autónoma através do recrutamento da maquinaria necessária de células bacterianas hospedeiras [41]. Estes podem ser considerados vetores não-virais frequentemente utilizados na terapia gênica, sendo subdivididos numa unidade transcricional que contém o gene terapêutico de interesse e as sequências reguladoras, e uma unidade com sequências bacterianas que incluem o gene de resistência a antibióticos e a origem de replicação [42].

As moléculas de DNA plasmídico são constituídas por uma cadeia dupla de DNA com as duas extremidades ligadas covalentemente, formando uma molécula circular [43]. Estas moléculas podem apresentar diferentes conformações que diferem no tamanho relativo (área espacial ocupada), carga, hidrofobicidade e na exposição das suas bases, nomeadamente a isoforma linear, circular aberta (oc) e superenrolada (sc) (Figura 11) [44].

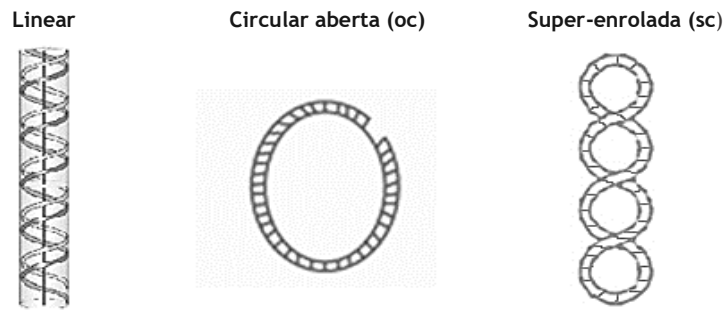


Figura 11: Representação esquemática das diferentes conformações do DNA plasmídico (Adaptado de [43]).

A isoforma sc é considerada a conformação biologicamente ativa por ser mais compacta devido ao fenômeno de torção exercido na dupla cadeia o que também resulta num aumento da densidade de carga por área de superfície e maior exposição de bases em comparação com outras conformações, sendo assim a molécula requerida para utilizar em terapia génica [44, 45]. Esta pode ser convertida nas restantes isoformas sobre ação de enzimas ou de certas condições físicas e químicas, como elevadas temperaturas e pH extremo, o que pode afetar o rendimento da purificação e recuperação desta isoforma de interesse [46]. As isoformas oc e linear são formadas quando ocorre um corte num lado da cadeia e dois cortes na cadeia dupla, respetivamente. Estas apresentam menor atividade biológica uma vez que estes danos podem ocorrer na cassette de expressão eucariota, não sendo recomendadas para aplicação clínica. Além disso, a isoforma linear fica com extremidades livres, aumentando o risco de ocorrer eventos de recombinação e integração no DNA genómico, e também pode sofrer mais rapidamente degradação intracelular em relação às restantes isoformas [43, 44].

### 1.6.1. Produção do DNA plasmídico

O processo de obtenção do DNA plasmídico é iniciado com a construção do vetor e a seleção da estirpe bacteriana apropriada, seguido da escolha e otimização das condições de produção, lise celular e, finalmente, o isolamento e purificação da isoforma sc. Este processo biotecnológico é dividido em três etapas, nomeadamente o processo *upstream*, a fermentação e o processo *downstream* (Figura 12) [47].

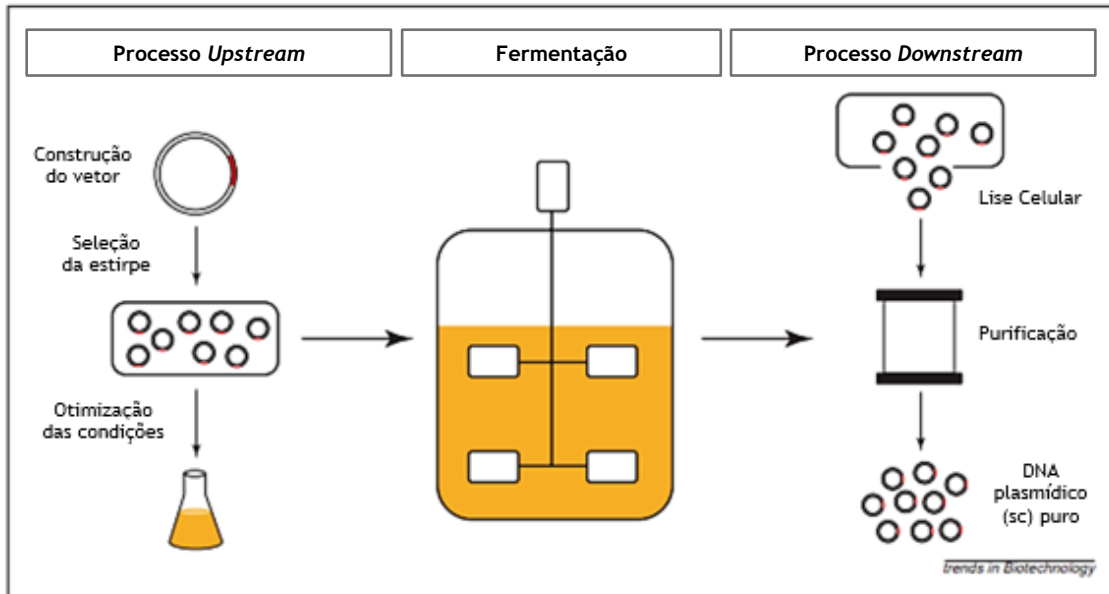


Figura 12: Representação esquemática das três etapas do processo biotecnológico (Adaptado de [47]).

O processo *upstream* tem como objetivo a produção do DNA plasmídico em larga escala, sendo necessário clonar o plasmídeo de interesse em estirpes bacterianas apropriadas como a *Escherichia coli* (*E. coli*), seguindo-se a fermentação para a replicar e amplificar do número de cópias do DNA plasmídico. As condições de crescimento da cultura bacteriana devem ser cuidadosamente selecionadas e otimizadas de modo a aumentar o rendimento de produção. Por sua vez, o processo *downstream* tem como objetivo a obtenção do DNA plasmídico com elevada pureza, de acordo com as especificações das agências reguladoras [45]. Primeiro, a biomassa produzida durante a fermentação necessita de ser recolhida através de centrifugação ou microfiltração. Subsequentemente, é necessário proceder à lise celular para a libertação do DNA plasmídico. Esta disrupção celular pode ser realizada através de métodos físicos ou métodos químicos, sendo a lise alcalina o método mais indicado para a obtenção do DNA plasmídico [48]. A lise celular promove a libertação de todos os componentes intracelulares, nomeadamente o DNA plasmídico sc e outras conformações, DNA genómico, RNA, proteínas e endotoxinas, sendo fundamental aplicar uma metodologia adequada para separar a biomolécula de interesse das restantes impurezas [47].

### 1.6.2. Purificação do DNA plasmídico

A purificação do DNA plasmídico a partir do lisado é considerada um desafio, uma vez que esta biomolécula possui propriedades físicas e químicas muito semelhantes com os ácidos nucleicos das células hospedeiras. Por outro lado, o isolamento da isoforma sc das isoformas menos efetivas torna-se um desafio adicional ao processo de purificação. Desta forma, a otimização do processo *upstream* no sentido de produzir uma elevada percentagem da isoforma de interesse pode facilitar o processo *downstream* [48].

A cromatografia líquida é o método de eleição para a purificação em larga escala de DNA plasmídico na isoforma sc. Esta metodologia tem como objetivo isolar e purificar seletivamente a molécula de interesse das restantes impurezas, através da interação estabelecida com suportes cromatográficos, tirando proveito das características da molécula alvo tais como tamanho, conformação, carga, hidrofobicidade e afinidade [47]. A composição química dos ligandos imobilizados nos suportes cromatográficos determina as interações preferenciais que irão ser estabelecidas com a biomolécula de interesse, e as características físicas e estruturais dos suportes determinam a disponibilidade e acessibilidade dos ligandos para estabelecer as interações. Diferentes técnicas cromatográficas que incluem princípios de exclusão molecular, troca iónica, interações hidrofóbicas e afinidade, têm sido continuamente exploradas para isolar o DNA plasmídico na isoforma sc [45].

#### **1.6.2.1. Cromatografia de exclusão molecular**

A cromatografia de exclusão molecular permite a separação dos componentes de uma amostra com base nas diferenças de tamanho. As moléculas de maior dimensão, como o DNA genómico e o DNA plasmídico, eluem rapidamente porque não conseguem entrar nos poros da matriz cromatográfica. As moléculas de menor dimensão, como RNA, endotoxinas e proteínas, realizam um percurso mais longo através dos poros da matriz sendo retardados na coluna cromatográfica. Deste modo, este tipo de cromatografia permite uma separação eficiente do DNA plasmídico das impurezas de menor dimensão, no entanto a remoção do DNA genómico e o isolamento da isoforma sc é dificultada [46, 47].

#### **1.6.2.2. Cromatografia de troca aniónica**

A cromatografia de troca aniónica permite a interação de biomoléculas com cargas opostas, nomeadamente dos grupos fosfato dos ácidos nucleicos carregados negativamente e dos ligandos imobilizados na fase estacionária carregados positivamente. No geral, a ligação das biomoléculas é favorecida para baixas concentrações de sal, e a eluição ocorre por aumento da força iónica que vai desestabilizar as interações dos diferentes ácidos nucleicos. Assim, estes sofrem eluição por ordem crescente de densidade de carga, que varia em função da conformação e tamanho molecular [47, 49]. Esta cromatografia possibilita a separação da isoforma sc do DNA plasmídico, uma vez que esta é mais compacta e possui uma maior densidade de carga em comparação com as restantes isoformas. No entanto, o DNA plasmídico apresenta muitas semelhanças em termos de carga, estrutura e composição química com o DNA genómico, RNA e endotoxinas, tornando a eliminação destas biomoléculas bastante limitada [46].

#### **1.6.2.3. Cromatografia de interação hidrofóbica**

A cromatografia de interação hidrofóbica explora as diferenças de hidrofobicidade entre diferentes biomoléculas. A ligação à matriz cromatográfica é promovida com elevadas concentrações de sal, nomeadamente de sulfato de amónio, que vai favorecer a remoção das

moléculas de água ordenadas em volta dos grupos hidrofóbicos das biomoléculas e dos ligandos imobilizados. A eluição ocorre por diminuição da força iônica da fase móvel, que vai enfraquecer as interações anteriormente estabelecidas, ocorrendo eluição das biomoléculas por ordem crescente de hidrofobicidade. Esta cromatografia pode ser aplicada à purificação do DNA plasmídico, explorando as diferenças de hidrofobicidade do DNA genômico, RNA, proteínas e endotoxinas. No entanto, a separação das diferentes isoformas nem sempre é conseguida [46, 50]. Além disso, o uso de elevadas concentrações de sal é considerado uma desvantagem, principalmente ao nível industrial, uma vez que está associado com elevados custos e impacto ambiental. Apesar das desvantagens apontadas e das fortes interações estabelecidas, esta técnica é frequentemente usada porque os danos estruturais para as biomoléculas são mínimos e a dessalinização das amostras no final dos ensaios permite manter a atividade biológica [50].

#### **1.6.2.4. Cromatografia de afinidade**

A cromatografia de afinidade utiliza ligandos específicos imobilizados na matriz cromatográfica para purificar determinadas biomoléculas, baseando-se nas suas funções biológicas ou na estrutura química individual, permitindo assim estabelecer interações múltiplas e reversíveis. Os métodos de afinidade apresentam vantagens, tais como o aumento da seletividade, o aumento do rendimento, sendo também possível realizar a purificação numa única etapa. Contudo, também apresentam limitações ao nível da origem biológica dos ligandos, sendo considerados frágeis e estando associados a baixas capacidades de ligação. Deste modo, desenvolveram-se ligandos sintéticos que combinam a seletividade dos ligandos naturais com a elevada capacidade e durabilidade dos ligandos sintéticos. Os passos de eluição podem ser realizados especificamente, usando um ligando competitivo, ou não especificamente, através de mudanças de pH, força iônica ou polaridade do tampão de eluição, dependendo das características das biomoléculas [46].

Diversos métodos de afinidade já foram descritos para a purificação de DNA plasmídico, tais como a imobilização de íons metálicos que interagem com ácidos nucleicos em cadeia simples, oligonucleótidos imobilizados que reconhecem sequências específicas presentes no DNA e promovem a formação de uma estrutura em tripla hélice, a imobilização de polimixina B que reconhece especificamente endotoxinas e a imobilização de proteínas ou complexos proteicos que reconhecem domínios específicos no DNA [46, 49].

Mais recentemente, a cromatografia de afinidade baseada em aminoácidos imobilizados revelou-se uma abordagem promissora para a purificação da isoforma sc do DNA plasmídico, explorando as interações que ocorrem naturalmente entre proteínas e ácidos nucleicos [43]. Estudos atômicos demonstraram que estas interações ocorrem preferencialmente entre aminoácidos carregados positivamente e as bases dos ácidos nucleicos [51, 52].

O nosso grupo de investigação demonstrou a versatilidade de aminoácidos carregados positivamente, tais como a histidina [53], a lisina [54] e a arginina [55], na purificação da isoforma sc do DNA plasmídico. Estes aminoácidos específicos foram imobilizados em matrizes de agarose, apresentando diferentes comportamentos de eluição. No entanto, as matrizes de histidina, lisina e arginina demonstraram um reconhecimento seletivo da isoforma sc do DNA plasmídico, permitindo a eliminação das restantes isoformas e impurezas do hospedeiro, com os graus de pureza requeridos e rendimentos de 40%, 46% e 79%, respetivamente [53-55]. Apesar dos aminoácidos imobilizados promoverem a seletividade desejada e reconhecimento da isoforma sc do DNA plasmídico, as fases estacionárias convencionais apresentam algumas limitações, tornando-se necessário explorar alternativas a estes suportes cromatográficos.

#### **1.6.2.5. Monolitos**

Os monolitos surgem como uma alternativa para a purificação de DNA plasmídico relativamente às colunas convencionais. Estes suportes consistem numa fase estacionária contínua preparada através de reações de polimerização de diferentes materiais, sendo estes polimerizados diretamente numa coluna como uma unidade única, tornando-se numa estrutura tridimensional de elevada porosidade e com canais interconectados relativamente grandes. O tamanho do poro é dependente das condições de polimerização, em especial a temperatura, sendo possível ajustar este parâmetro de acordo com as aplicações pretendidas [45]. A preparação dos monolitos é relativamente simples e, como materiais, são utilizados polímeros orgânicos, inorgânicos ou híbridos [56].

A elevada porosidade aumenta a acessibilidade das biomoléculas a toda a estrutura monolítica, permitindo também um aumento da permeabilidade, uma migração uniforme através do suporte e uma diminuição da pressão do sistema cromatográfico. Devido à sua estrutura específica, os monolitos permitem ultrapassar limitações associadas às colunas convencionais, como a baixa capacidade de ligação e limitações do fluxo. Assim sendo, os suportes monolíticos permitem separações rápidas, sem comprometer a resolução cromatográfica e a separação [45, 57]. Outra característica importante consiste no aumento da transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária, uma vez que o fluxo neste tipos de suportes ocorre por convecção, favorecendo assim a transferência de massa [58]. Para além disto, os monolitos também possuem uma elevada flexibilidade química que permite a imobilização de vários tipos de ligandos e a sua utilização em diversos tipos de separações [59]. Deste modo, a tecnologia monolítica pode ser aplicada a qualquer princípio cromatográfico [60].

Assim, combinar a seletividade dos ligandos baseados em aminoácidos e as vantagens dos monolitos torna-se uma estratégia promissora para a purificação da isoforma sc do DNA plasmídico. O nosso grupo de investigação também já utilizou com sucesso monolitos modificados com os aminoácidos arginina [61] e histidina [62] na purificação de uma vacina de DNA plasmídico HPV-16 E6/E7.

De acordo com o que foi descrito anteriormente, é possível constatar que a purificação da biomolécula de DNA plasmídico já foi amplamente explorada, sendo possível aplicar diferentes metodologias e suportes cromatográficos para a obtenção com sucesso da isoforma de interesse para aplicação terapêutica. Contudo, recentemente tem surgido um grande desafio no que diz respeito à obtenção e purificação de um vetor de DNA inovador, designado de DNA minicircular, uma molécula resultante da recombinação do DNA plasmídico.

## 1.7. DNA minicircular

Apesar do DNA plasmídico ser um produto biofarmacêutico de elevado interesse em abordagens terapêuticas associadas com a terapia gênica, apresenta algumas limitações ao nível da aplicabilidade clínica, estando estas associadas com a sua estrutura e atividade intrínseca [42]. As sequências bacterianas e os motivos CpG presentes no DNA plasmídico podem desencadear respostas imunológicas adversas no hospedeiro, levando à eliminação sistemática do vetor e, deste modo, levantando sérios problemas ao nível da biocompatibilidade. Os genes que conferem resistência a antibióticos podem sofrer disseminação para a flora bacteriana humana, através de transferência horizontal de genes. Para além disto, após um curto período de tempo da administração do DNA plasmídico, ocorre uma diminuição acentuada da atividade *in vivo*, que se traduz no silenciamento da expressão de genes em células eucarióticas [63-65]. No sentido de ultrapassar estas limitações, surgiu recentemente o vetor de DNA minicircular (mcDNA).

O mcDNA é uma molécula de DNA circular de cadeia dupla que foi isolada pela primeira vez por Cozzarelli e colaboradores em 1968, através da estirpe *Escherichia coli* 15 [66]. A biossíntese do mcDNA é realizada através da indução de um processo de recombinação de um plasmídeo parental (PP). Tal como o DNA plasmídico, o PP contém as sequências bacterianas, a cassette de expressão eucariótica, e adicionalmente as sequências para o reconhecimento enzimático responsáveis pela recombinação [42]. Após indução, o PP é recombinado em duas moléculas de DNA, nomeadamente em mini-plasmídeo (mP) que contém as sequências procariotas, tais como a origem de replicação bacteriana e o gene de resistência a antibióticos, e em mcDNA que apenas contém as sequências eucariotas, tais como o gene terapêutico e o promotor responsável pela expressão em células eucarióticas [64].

O objetivo das tecnologias baseadas em mcDNA consistem em desenvolver abordagens terapêuticas mais seguras e eficientes devido à ausência das sequências bacterianas. O seu tamanho reduzido facilita a entrada nas células, aumentando a eficiência de transfecção e a eficácia terapêutica quando administrado a linhas celulares. Além disto, o mcDNA apresenta também a vantagem de promover uma expressão persistente dos genes terapêuticos [42].

### 1.7.1. Produção do DNA minicircular

As tecnologias para a produção do mcDNA baseiam-se em sistemas de recombinação *in vivo* que convertem o DNA plasmídico, mais especificamente o PP, em moléculas circulares mais pequenas, durante o processo de fermentação bacteriana [64]. Alguns dos sistemas já utilizados foram a integrase Lambda, a resolvase ParA e a recombinase Cre. Estas metodologias foram recentemente otimizadas para a produção do mcDNA através do sistema recombinase  $\Phi$ C31/endonuclease I-SceI, numa estirpe geneticamente modificada de *E. coli*. Mais concretamente, a estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T tem a particularidade de possuir um sistema indutível através de L-arabinose que, na presença deste substrato, ativa a expressão simultânea da recombinase  $\Phi$ C31 e da endonuclease I-SceI [67]. Após indução, a enzima recombinase  $\Phi$ C31 realiza a conversão do PP em mP e em mcDNA, através do reconhecimento das sequências de recombinação attB e attP. Após este processo, as moléculas de PP e mP são degradadas pela endonuclease I-SceI, que reconhece o local de restrição 32x Scl presente nestes dois vetores (Figura 13) [64].

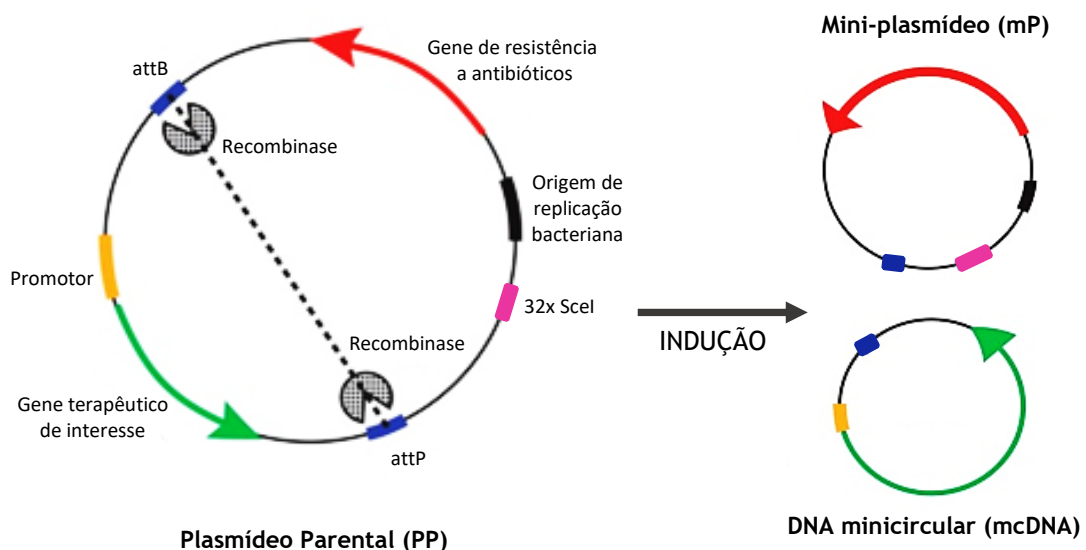


Figura 13: Representação esquemática da produção do mcDNA a partir do PP (Adaptado de [63]).

Existem alguns parâmetros que afetam a produção do mcDNA, nomeadamente a temperatura, o tempo de indução e a concentração do indutor. Estes parâmetros são importantes na medida em que influenciam os níveis de mcDNA produzidos e a quantidade de contaminantes inerentes ao processo de recombinação. Estudos anteriores demonstraram que o rendimento da produção de PP aumenta quando a fermentação bacteriana é realizada a 42°C, seguido do aumento do rendimento da produção de mcDNA quando o processo de indução com L-arabinose é realizado a 32°C [64].

Quando toda a tecnologia de produção do mcDNA ocorre de forma efetiva, é esperado que das moléculas de PP e mP sejam degradadas, o que facilitaria as etapas posteriores de purificação [68]. No entanto, tem-se verificado que permanecem quantidades residuais destas duas biomoléculas, sugerindo que a recombinação não é completa e que o processo de degradação realizado pela endonuclease I-SceI não é totalmente efetivo [69]. Deste modo, torna-se necessário investigar métodos de purificação eficazes no isolamento da biomolécula de interesse, o mcDNA.

### 1.7.2. Purificação do DNA minicircular

Quando o processo de recombinação *in vivo* do PP não ocorre de forma eficiente, as amostras finais de lisado bacteriano vão apresentar uma grande diversidade de espécies, nomeadamente diferentes isoformas de mcDNA e de mP e PP que não sofreram recombinação, e todos os constituintes bacterianos (como RNA, DNA genómico, proteínas e endotoxinas) sendo essencial aplicar um processo de purificação eficiente para isolar a biomolécula de interesse de preferência na conformação superenrolada. No entanto, as metodologias atuais estabelecidas para a purificação do DNA plasmídico não se adequam à purificação do mcDNA, uma vez que os contaminantes de PP e mP são muito semelhantes em termos de tamanho e topologia molecular, sendo necessário ajustar ou investigar novas metodologias [70].

O primeiro método descrito para a obtenção do mcDNA baseia-se na linearização do PP e mP através de enzimas de restrição adequadas, seguido do isolamento do mcDNA através de um gradiente de centrifugação com cloreto de cézio [71]. Este método apresenta várias desvantagens, nomeadamente o baixo rendimento de mcDNA e o elevado custo das enzimas, não sendo adequado para a produção em larga escala. Além disso, este método é incompatível com as condições impostas pelas agências reguladoras [72].

Outra estratégia de purificação do mcDNA baseia-se numa cromatografia de afinidade, explorando a interação da proteína repressora do operão da lactose (LacI) e a correspondente sequência operadora. Deste modo, é necessário a incorporação destas sequências operadoras no mcDNA, que irão interagir reversivelmente com a proteína repressora LacI que foi previamente imobilizada na coluna cromatográfica. Esta metodologia prevê que quando a fase móvel arrastar a amostra pela coluna, o mcDNA fique retido e o mP seja eluído. Posteriormente, o mcDNA será recuperado por aplicação de um tampão apropriado. Contudo, esta técnica apenas promove a separação do mcDNA e do mP, caso exista PP na amostra este também irá interagir com a matriz. Também apresenta como desvantagem o facto de ser necessário um passo anterior de incorporação de sequências específicas no PP, além do fabrico dispendioso da matriz que envolve a imobilização de uma proteína recombinante [65].

A tecnologia do DNA *triplex* surge como outro método de isolamento do mcDNA. Esta estratégia baseia-se na formação de estruturas reversíveis em tripla hélice, entre oligonucleótidos de pirimidina em cadeia simples e sequências de purina em cadeia dupla inseridas na molécula

alvo. Para isto, é fundamental que o PP sofra uma modificação prévia na zona procariótica, para que tanto este como o mP incorporem sequências específicas que serão reconhecidas pelos oligonucleótidos. Primeiramente, é necessário que o lisado bacteriano sofra uma pré-purificação através de uma coluna comercial de troca aniônica. De seguida, os vetores pré-purificados são incubados com oligonucleótidos biotinilados e esferas magnéticas revestidas por estreptavidina, sendo que os complexos formados são removidos do meio através da captura das esferas magnéticas por ação de um ímã. Esta metodologia torna-se eficiente na eliminação de PP e mP e no isolamento de mcDNA a partir de uma amostra pré-purificada, contudo não pode ser aplicada numa amostra de lisado, ficando o mcDNA misturado com os constituintes das células hospedeiras. Além disso, as esferas magnéticas revestidas por estreptavidina podem ser dispendiosas, apresentando-se também como desvantagem o facto de ser necessário uma etapa prévia de incorporação de sequências específicas no PP [73].

Outra estratégia desenvolvida para a obtenção de mcDNA consiste numa modificação inicial do PP, de modo a incorporar uma sequência de reconhecimento para a endonuclease Nb.BbvCI na zona de sequências procarióticas. Desta forma, após lise celular e clarificação do lisado, é realizada uma incubação *in vitro* da amostra com esta endonuclease, que por sua vez vai cortar apenas um dos lados da dupla cadeia do PP que não sofreu recombinação e do mP. Como resultado, estas moléculas adquirem a conformação oc, enquanto que o mcDNA permanece intacto na isoforma sc. Seguidamente, procede-se ao isolamento da isoforma sc do mcDNA das restantes moléculas de DNA na confirmação oc, assim como do RNA bacteriano, através de cromatografia de interação hidrofóbica. No entanto, esta é uma metodologia demorada e dispendiosa, uma vez que envolve vários passos sequenciais e são utilizadas enzimas de restrição, sendo também necessário uma etapa prévia de incorporação de sequências específicas no PP [70].

Mais recentemente, foi estabelecida uma estratégia de purificação que envolve a utilização de uma coluna monolítica de troca aniônica (CIM® DEAE-1). Esta estratégia permite a purificação da isoforma sc do mcDNA a partir de uma amostra de lisado clarificada, eliminando impurezas resultantes do processo de recombinação, nomeadamente o PP e o mP, assim como impurezas inerentes ao processo de produção em *E. coli*, como o RNA. Esta metodologia apresenta vantagens como o facto de ser rápida, utilizar uma coluna comercial e não serem necessárias modificações iniciais do PP. No entanto, a recuperação da isoforma sc do mcDNA é inferior a 50%, uma vez que parte desta molécula co-elui com outras biomoléculas em diferentes picos cromatográficos [69].

Apesar destes estudos iniciais, ainda não foi descrita uma estratégia de purificação considerada totalmente eficiente e rentável. Deste modo, torna-se necessário desenvolver novas estratégias que permitam isolar a isoforma sc do mcDNA com elevada pureza e rendimento, para poder ser aplicada em terapias génicas como um vetor mais seguro e eficaz, de acordo com as condições impostas pelas agências reguladoras.



## Capítulo 2 - Objetivos

O HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do cancro do colo do útero, sendo o quarto cancro que mais afeta as mulheres em todo o mundo. Atualmente não existem tratamentos direcionados para este tipo de cancro, surgindo uma necessidade urgente em encontrar novas estratégias terapêuticas. As oncoproteínas E6 e E7 do HPV são responsáveis pela progressão deste tumor devido à inativação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, respetivamente. Desta forma, a utilização de biofármacos que silenciem a expressão das oncoproteínas E6 e E7 e que restabeleçam os níveis de p53 e pRb, pode ser uma estratégia promissora para o tratamento do cancro do colo do útero. Existem casos de sucesso da aplicação do vetor não-viral de DNA plasmídico em inúmeras doenças, como é o caso do cancro. Contudo, a possibilidade de usar um vetor mais seguro, devido à ausência de genes bacterianos, e que aumente a eficiência de transfecção e expressão persistente do gene terapêutico, torna o vetor de mcDNA como uma alternativa promissora ao DNA plasmídico.

Assim, o presente trabalho de mestrado pode ser dividido nos seguintes objetivos:

- Produção e purificação de vetores de PP e mcDNA que codificam para o gene supressor de tumor p53, através de um kit comercial para o PP-p53 e explorando estratégias de cromatografia de afinidade e filtração em gel para o mcDNA-p53;
- Estudos de transfecção *in vitro* com células cancerígenas do colo do útero, de modo a avaliar a eficiência de transfecção dos vetores PP-p53 e mcDNA-p53 e o efeito terapêutico do gene codificado nestes vetores;
- Construção de um vetor de mcDNA multigénico, com clonagem de dois genes terapêuticos no PP, nomeadamente o gene p53 e o gene pri-miRNA-375, visando uma potencial aplicação terapêutica combinada e mais eficaz no cancro do colo do útero.



# Capítulo 3 - Materiais e Métodos

## 3.1. Produção

### 3.1.1. Plasmídeo parental utilizado

O plasmídeo parental pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40Poly A (Addgene, Estados Unidos da América) foi previamente clonado com o gene supressor de tumor p53 (PP-p53) pelo nosso grupo de investigação. Este vetor contém também um gene de resistência à canamicina e os locais de recombinação attB e attP para a produção do mcDNA (Figura 14).

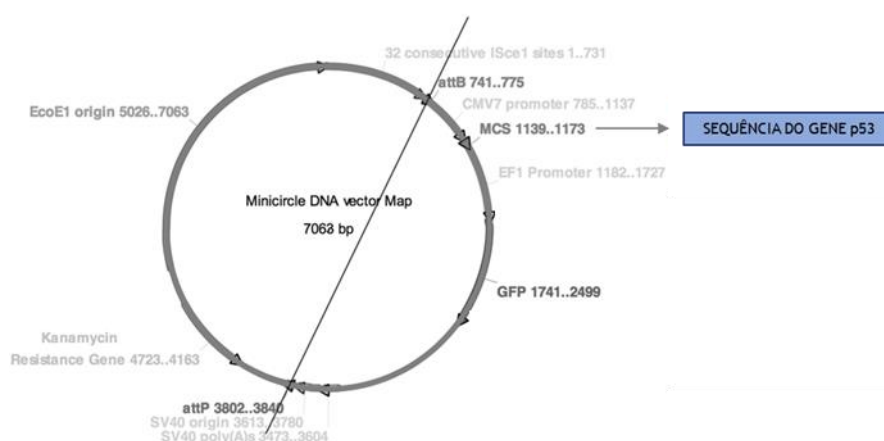


Figura 14: Representação esquemática do plasmídeo parental clonado com o gene p53 (PP-p53).

### 3.1.2. Condições do crescimento bacteriano

Primeiramente, a estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T transformada com o PP-p53 foi inoculada em placas de LB-agar contendo canamicina (50 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América). Depois do crescimento em meio sólido, as colónias foram inoculadas para uma pré-fermentação ( $v = 62,5$  mL) em meio *Terrific Broth* (TB), constituído por 20 g/L triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 0,017M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,072M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , suplementado com canamicina (50 µg/mL). O crescimento bacteriano foi promovido a 42 °C e sob agitação de 250 rpm (Agitorb 200 IC, Aralab, Portugal) até atingir uma densidade ótica a 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) de aproximadamente 2,6. De seguida, foi calculada a quantidade de cultura bacteriana que seria necessário transferir para uma fermentação ( $v = 250$  mL), de modo a iniciar com uma  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,2$ . Para a produção do PP-p53, o crescimento bacteriano foi novamente promovido a 42 °C com agitação a 250 rpm, até atingir uma  $\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 5$ . De seguida, para induzir a produção do mcDNA-p53, foi adicionada uma mistura de indução ( $v = 250$  mL) constituída por 25 g/L de meio

*Luria-Bertani Broth* (LB) (BIOKAR Diagnostics, França) e 0,04 M de NaOH, contendo também L-arabinose para uma concentração final de 0,01% (m/v). Este processo de indução foi realizado durante 2 horas a 32 °C e sob agitação de 250 rpm. Por último, as células foram recuperadas através de centrifugação a 4500 g durante 10 minutos a 4 °C. Os *pellets* bacterianos foram armazenados a -20 °C, para posteriormente realizar a extração do mcDNA-p53.

## 3.2. Purificação

### 3.2.1. Extração de PP-p53

Para a extração do PP-p53 foi utilizado o Kit NZYMaxiprep (NZYTech - Genes and Enzymes, Portugal) destinado para pré-purificar o DNA plasmídico, de acordo com as instruções do fabricante. Após lise celular, o DNA plasmídico ligou-se seletivamente às colunas de troca aniônica e todos os contaminantes, tais como proteínas, RNA, e moléculas de baixo peso molecular foram eliminados. No passo de eluição, a carga positiva da coluna foi neutralizada por uma mudança de pH para condições ligeiramente alcalinas e o DNA plasmídico foi eluído com um tampão de elevada concentração de sal. Após eluição, o DNA plasmídico foi precipitado com 0,7 volumes de isopropanol gelado e incubado durante 30 minutos no gelo, tendo sido realizada uma centrifugação a 16000 g durante 30 minutos a 4 °C. Depois de descartar o sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em tampão 10mM Tris-HCl (pH 8,0). As amostras finais de PP-p53 foram quantificadas através de nanofotómetro (Implen GmbH, Alemanha) e armazenadas a -80 °C, para posteriormente serem utilizadas nos ensaios de transfecção.

### 3.2.2. Lise alcalina modificada

Com o objetivo de obter amostras de lisado para utilizar na purificação cromatográfica, foi realizado o método de lise alcalina modificada, como descrito por Diogo *et al.*, 2000 [74]. Deste modo, o *pellet* bacteriano resultante da fermentação de 250 mL foi ressuscitado em 20 mL de solução 1 (50 mM glicose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA com pH 8,0). A lise alcalina foi realizada pela adição de 20 mL de solução 2 (200 mM NaOH, 1% (m/v) de SDS) e incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente. Para neutralizar esta reação, foram adicionados 20 mL de solução 3 (3 M acetato de potássio com pH 5,0) e incubou-se durante 20 minutos no gelo. A eliminação de detritos celulares, DNA genómico e proteínas foi realizada através de duas centrifugações a 20000 g durante 30 minutos a 4 °C, na centrífuga Allegra™ 25R (Beckman Coulter, Estados Unidos da América). Os ácidos nucleicos presentes no sobrenadante foram precipitados através da adição de 0,7 volumes de isopropanol gelado e incubação durante 30 minutos no gelo. De seguida, foi realizada com uma centrifugação a 16000 g durante 30 minutos a 4 °C. Depois de descartar o sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em 2 mL de tampão 10 mM Tris-HCl (pH 8,0). De modo a precipitar proteínas e RNA, foi adicionado sulfato de amónio

para uma concentração final de 3M e incubou-se durante 15 minutos no gelo. Estas impurezas foram removidas através de centrifugação a 16000 g durante 20 minutos a 4 °C, recuperando-se o sobrenadante. As amostras finais foram quantificadas através de nanofotómetro (Implen GmbH, Alemanha) e armazenadas a -80 °C, de modo a serem utilizadas posteriormente na cromatografia de afinidade ou na cromatografia de exclusão molecular. Para a obtenção de amostras simples de lisado, foi apenas realizada uma alteração a este protocolo, adicionando RNase (500 µg/mL) à solução 1.

### **3.2.3. Purificação do mcDNA-p53 através de cromatografia de afinidade**

Os ensaios cromatográficos foram realizados no sistema AKTA Pure (GE Healthcare Biosciences, Suécia) com o *software* UNICORN (versão 6.3). Estes tiveram como objetivo explorar novas estratégias de purificação do mcDNA-p53, utilizando suportes cromatográficos baseados em histidina. Para isto, foram estudadas duas colunas monolíticas CIM® (volume de coluna = 0,1 mL) modificadas com os ligandos L-histidina e 1-benzil-L-histidina (BIA Separations, Eslovénia) para promover a purificação do mcDNA-p53 a partir de amostras de lisado pré-purificadas. De forma geral, os monolitos foram equilibrados com 3 M e 1,65 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respetivamente, a 1 mL/min, e foram injetados 100 µL de amostra de lisado cuja força iónica foi previamente ajustada. Para a eluição das espécies ligadas foram estudados gradientes decrescentes de sulfato de amónio, assim como a manipulação de pH usando dos tampões Tris-EDTA (pH 8,0) e citrato-EDTA (pH 5,0). Todos os ensaios cromatográficos foram realizados à temperatura ambiente e a absorvância a 260 nm foi monitorizada ao longo do tempo. Todas as frações recolhidas foram dessalinizadas e concentradas para um volume final de 100 µL em concentradores Vivaspin® para posteriormente se realizar a análise dos resultados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. No final dos ensaios cromatográficos, a coluna monolítica e o sistema foram lavados com água milli-Q.

### **3.2.4. Purificação do mcDNA-p53 através cromatografia de filtração em gel**

A cromatografia de filtração em gel foi outra estratégia explorada com o objetivo de promover a separação do PP-p53, mcDNA-p53 e RNA de acordo com as diferenças de tamanho molecular, a partir de amostras de lisado provenientes de lise alcalina modificada. Para tal, foi utilizada uma coluna Sephacryl S-1000 SF (GE Healthcare Biosciences, Suécia) (volume de coluna = 106 mL), equilibrada com 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl (pH 7,0) e o ensaio foi realizado com um caudal de 0,3 mL/min. Foram injetados 2 mL de amostra de lisado e foram recolhidas frações de 4 mL ao longo do tempo. O ensaio cromatográfico foi realizado à temperatura ambiente e a absorvância foi monitorizada ao longo do tempo a 260 nm. Todas as frações recolhidas foram dessalinizadas e concentradas para um volume final de 200 µL em concentradores Vivaspin® para posteriormente se realizar a análise dos resultados através de eletroforese em gel de agarose 0.8%. Por último, foram selecionadas e quantificadas as frações que possuíam maioritariamente mcDNA-p53.

### 3.2.5. Eletroforese em gel de agarose

Todas as frações cromatográficas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) em tampão TAE (40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA, pH 8,0). O gel foi corado com 0,016 µL/mL de reagente GreenSafe Premium (NZYTech - Genes & Enzymes, Portugal) e o marcador de peso molecular utilizado foi o GRS Ladder 1kb (GRiSP - Research Solutions, Portugal). A corrida de eletroforese foi realizada durante 40 minutos a 110 V e o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) num transiluminador UVITEC Fire-Reader (UVITEC, Reino Unido).

### 3.2.6. Análise das amostras purificadas - Densitometria de bandas

Com o objetivo de selecionar as amostras a serem utilizadas nos estudos *in vitro*, obtidas pelas estratégias cromatográficas de afinidade e filtração em gel, foi avaliada a pureza relativa por densitometria de bandas. Para isto, foram comparadas as frações purificadas de mcDNA-p53 obtidas através do melhor resultado de cromatografia de afinidade e de filtração em gel, comparando a razão existente entre PP-p53 e mcDNA-p53. Deste modo, a densidade relativa de bandas foi analisada a partir das respetivas imagens de eletroforese em gel de agarose, com o *software* ImageJ (versão 1.45s), de acordo com o descrito por Antiabong *et al.*, 2016 [75].

## 3.3. Estudos de transfecção *in vitro*

### 3.3.1. Linhas celulares e condições de cultura

As células HeLa (células provenientes de adenocarcinoma cervical, HPV-18) foram cultivadas em meio DMEM-HG (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose*), as células CaSki (células metastáticas provenientes de carcinoma epidermoide cervical, HPV-16) foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) e os Fibroblastos 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). 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.

### 3.3.2. Transfecção

Os estudos *in vitro* tiveram como objetivo comparar a eficiência de transfecção entre os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, assim como avaliar o efeito terapêutico do gene codificado nestes vetores. Para isto, foi utilizado o regente de transfecção 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 80%-90%, 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 transfecção foi incubado com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 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) : Torpedo<sup>DNA</sup> (µL) utilizado foi de 1:3. As misturas reacionais foram adicionadas aos respetivos poços e as células transfectadas foram novamente incubadas com as mesmas condições de cultura. Após 6 horas do início da transfecção, o meio incompleto sem antibiótico foi substituído por meio completo.

### **3.3.3. Internalização celular - *Live Cell Imaging***

Para verificar a internalização dos vetores PP-p53 e mcDNA-p53 no núcleo de células transfectadas, foi realizada a marcação destes com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e realizada a aquisição de imagens em tempo real (*live cell imaging*). Para isto, foi preparada uma mistura reacional com 750 ng de cada um dos vetores, perfazendo com *labeling buffer* (0,1 M de tetraborato de sódio) para um volume final de 83 µL, adicionando por último, 2 µL de FITC preparado com dimetilsulfóxido (DMSO). Esta mistura reacional foi colocada num agitador rotativo a baixa velocidade durante 4 horas à temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, foi adicionado 1 volume de 3 M NaCl e 5 volumes de etanol 100% gelado, incubando-se *overnight* a -20 °C. Após este período de incubação, o excesso de FITC foi removido por centrifugação a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C, descartando o sobrenadante e lavando o *pellet* com etanol 75%. Centrifugou-se novamente a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C e ressuspendeu-se o *pellet* em PBS. As células HeLa foram semeadas com uma densidade de  $15,6 \times 10^4$  células/poço numa placa µ-slide 4 (ibidi GmbH, Alemanha). No dia seguinte, os núcleos das células foram marcados com DAPI (1:1000) durante 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente. Foram adquiridas imagens antes da transfecção, e só depois as células foram transfectadas com o DNA plasmídico marcado previamente com FITC. Para a aquisição de imagens foi utilizado o sistema de microscopia confocal LSM 710 (Carl Zeiss SMT, Alemanha) com o *software* Zeiss Zen.

### **3.3.4. Eficiência de transfecção - Microscopia de Fluorescência**

Para comparar a eficiência de transfecção entre os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, foi realizada novamente a marcação destes com FITC e realizada a aquisição de imagens de células não-transfectadas (controlo) e células transfectadas durante 1, 2 e 6 horas. Para isto, as células HeLa foram semeadas com uma densidade de  $6,2 \times 10^4$  células/poço numa placa µ-slide 8 (ibidi GmbH, Alemanha). Posteriormente, as células foram transfectadas com os vetores marcados previamente com FITC. De modo a parar a transfecção, o meio de cultura foi descartado e os poços foram lavados com PBS. Seguidamente, foi realizada uma incubação com paraformaldeído (PFA) durante 10 minutos e, após lavagem com PBS, foi realizada uma

incubação com DAPI (1:1000) durante 10 minutos no escuro. Para a aquisição de imagens foi utilizado o sistema de microscopia confocal LSM 710 (Carl Zeiss SMT, Alemanha) com o *software* Zeiss Zen. A análise estatística dos resultados de intensidade de fluorescência média do FITC (n = 3) foi realizada com o teste *two-way* ANOVA, através do *software* GraphPad Prism (versão 6.01).

### 3.3.5. Extração de RNA

As células HeLa foram semeadas com uma densidade de  $2,4 \times 10^5$  células/poço numa placa de 12 poços (VWR International, Estados Unidos da América). Após 24 horas de transfecção com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, as células controlo e transfectadas foram submetidas à extração de RNA. Para isto, foram adicionados 250 µL 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 µL de clorofórmio para permitir a separação das diversas biomoléculas em diferentes fases, incubando-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas 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 µL 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 µL 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 µL 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 foram realizadas com nanofotómetro (Implen GmbH, Alemanha).

### 3.3.6. 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.

### 3.3.7. RT-PCR

A técnica de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) foi realizada com o objetivo de analisar os níveis de transcritos do gene supressor de tumor p53. Para isto, foi adicionado 1 µL de cDNA, 6,25 µL de Taq polimerase, 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> e 0,4 µL de cada um dos *primers*, perfazendo com água até um volume final de 12,5 µL. 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 40 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 1 minuto a 72 °C, e por último, 5 minutos a 72 °C. Os *primers* utilizados foram 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'). Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%.

### 3.3.8. Extração de proteína

As células HeLa foram semeadas com uma densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/poço numa placa de 6 poços (VWR International, Estados Unidos da América). Após 36 horas e 48 horas de transfecção com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, as células controlo e transfectadas foram submetidas à extração de proteína. Primeiramente, procedeu-se à remoção do meio de cultura e à lavagem de cada poço com PBS. De seguida, as células foram raspadas com *cell scrapers* com o intuito de recuperar as células, e foi realizada uma centrifugação a 11500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, numa centrífuga Hettich Mikro 200R (Andreas Hettich GmbH, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se o tampão de lise (Roche, Estados Unidos da América), de acordo com o tamanho do *pellet*. Este tampão de lise é constituído por 25 mM Tris (pH 7,4), 2,5 mM EDTA, 2% Triton X-100, 2,5 mM EGTA, 1 mM PMSF e 10 µL/mL de cocktail inibidor de proteases sem EDTA. Por último, foi realizada uma incubação durante 10 minutos no gelo.

### 3.3.9. Quantificação de proteína

Após a extração, foi utilizado o método de Bradford para determinar a concentração de proteína. Assim, numa microplaca foram realizados triplicados com 1 µL de amostra de proteína extraída, 159 µL de água milli-Q e 40 µL de reagente BioRad. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorvância a 595 nm foi lida num espectrofotómetro de microplacas xMark (BioRad, Estados Unidos da América). Para determinar a concentração de proteína extraída, foi construída uma curva de calibração, usando a albumina do soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) como proteína padrão (0,2-10,0 µg/µL), como está representado na Figura 15.

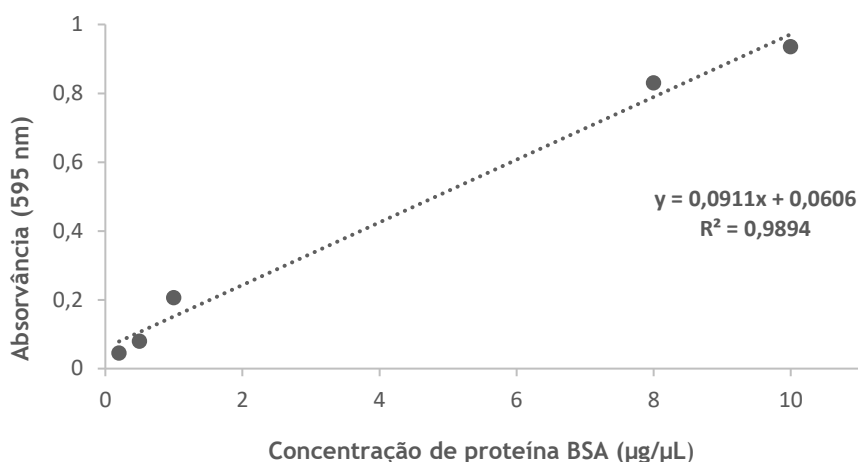


Figura 15: Curva de calibração com a proteína padrão BSA (0,2 - 10 µg/µL).

### 3.3.10. SDS-PAGE e Western Blot

Após a extração e quantificação de proteína, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, designada de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Esta técnica tem como objetivo separar as proteínas principalmente de acordo com o seu peso molecular. Assim, as amostras foram preparadas com 25 µg de proteína total, calculadas através da curva de calibração anterior, adicionando-se *loading buffer* num rácio de 3:1 (3,3 µL para 10 µL de amostra total). As amostras foram desnaturadas durante 5 minutos a 100 °C, injetadas num *stacking* gel de acrilamida 4,7% para posteriormente serem separadas num *resolving* gel de acrilamida 12,5%. O marcador de peso molecular utilizado foi o NZYColour Protein Marker II (NZYTech - Genes and Enzymes, Portugal). A corrida de eletroforese foi realizada a 120 V durante 90 minutos à temperatura ambiente. A eletrotransferência consistiu na transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), previamente ativada com metanol, através da aplicação de uma corrente elétrica de 750 mA, durante 90 minutos a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS, contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T 0,1%), durante 5 minutos. A membrana foi bloqueada com uma solução de leite 5% (m/v) durante 1 hora, à temperatura ambiente e em agitação constante, com o objetivo de impedir interações inespecíficas entre a membrana e o anticorpo utilizado para a deteção da proteína alvo. A membrana foi novamente lavada 3 vezes durante 5 minutos, para se poder proceder à incubação com o anticorpo monoclonal anti-p53 ou anti-β-actina (Santa Cruz Biotechnology, Alemanha), *overnight* a 4 °C, com agitação constante. Após esta incubação, procedeu-se novamente à lavagem da membrana, de modo a realizar a incubação com o anticorpo secundário policlonal IgG anti-*rabbit* ou anti-*mouse* (Santa Cruz Biotechnology, Alemanha), durante 1 hora à temperatura ambiente e com agitação constante. Procedeu-se novamente à lavagem da membrana, seguindo-se uma incubação com 200 µL de ECL (Advansta Inc., Estados Unidos da América) durante 5 minutos. A membrana foi visualizada no sistema BioRad ChemiDoc™ (BioRad, Estados Unidos da América).

### 3.3.11. Quantificação da proteína p53 - ensaio ELISA

O ensaio ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi realizado para a determinação quantitativa da proteína p53, após 36 horas de transfecção. Para isto, foi utilizado o Kit Human p53 Platinum ELISA (Enzo, Life Sciences, Estados Unidos da América), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Este ensaio baseia-se no reconhecimento antigénio-anticorpo detetável através de reações enzimáticas. O anticorpo monoclonal anti-p53 encontra-se adsorvido nos poços da microplaca fornecida. Para iniciar o ensaio, as amostras provenientes de várias diluições do padrão de p53 fornecido pelo kit (50 - 0,78 U/mL) e as amostras de proteína extraída das células controlo e das células transfectadas (20 µg de proteína total) foram adicionadas aos poços, reagindo com o anticorpo previamente adsorvido. De seguida, foi adicionado um segundo anticorpo monoclonal anti-p53 conjugado com biotina, que liga à proteína p53 capturada pelo primeiro anticorpo. Os anticorpos conjugados com biotina que não ligaram foram removidos com solução de lavagem. Posteriormente, foi adicionada uma solução de enzima Horseradish Peroxidase (HRP) conjugada com estreptavidina que promove ligação à biotina. Os conjugados que não sofreram ligação foram também removidos com solução de lavagem. Por último, foi adicionada uma solução reativa com o substrato tetrametilbenzidina, que é convertido num composto colorido através da enzima HRP. Esta reação enzima-substrato foi terminada pela adição de ácido fosfórico e o desenvolvimento de cor foi medido espectrofotometricamente a uma absorvância de 450 nm. Células HeLa não-transfectadas foram utilizadas como controlo. O ensaio foi realizado com um n = 4 e a análise estatística foi realizada com o teste *one-way* ANOVA, através do *software* GraphPad Prism (versão 6.01).

Para determinar a concentração da proteína p53 nas amostras de interesse, foi construída uma curva de calibração com os resultados obtidos nas amostras padrão analisadas com diferentes concentrações desta proteína (50,00 - 0,78 U/mL), como está representado na Figura 16.

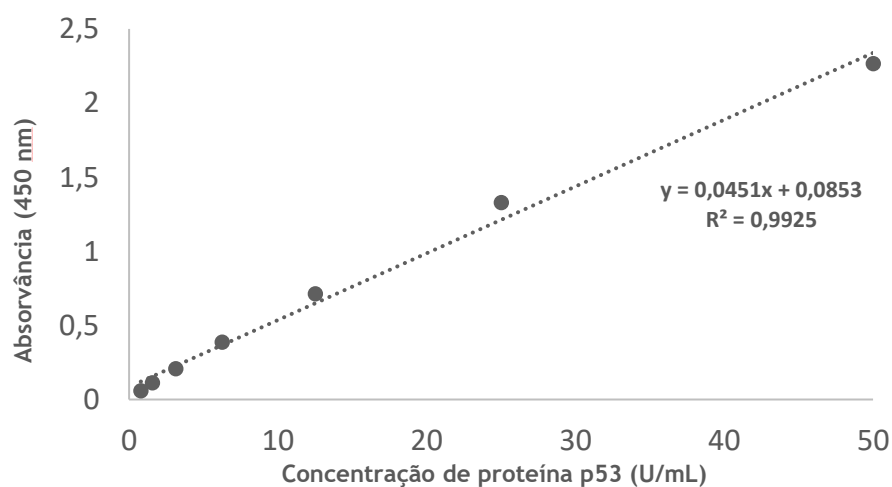


Figura 16: Curva de calibração com a proteína p53 (50,00 - 0,78 U/mL).

### **3.3.12. Ensaio de proliferação celular**

A proliferação celular foi avaliada ao longo do tempo, através da contagem do número de células viáveis. As células HeLa foram semeadas com uma densidade de  $6,02 \times 10^4$  células/poço em placas de 12 poços. As transfecções com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 foram realizadas durante 24, 36, 48 e 72 horas. De modo a parar a transfecção, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se tripsina a cada um dos poços. Posteriormente, as células foram recolhidas através de centrifugação e o número de células aderentes viáveis foi determinada usando o método de exclusão por azul de tripano. Células não-transfectadas foram utilizadas como controlo. Os ensaios foram realizados com um  $n = 3$  e a análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA, através do *software* GraphPad Prism (versão 6.01).

### **3.3.13. Avaliação da citotoxicidade celular - Ensaio com resazurina**

A citotoxicidade dos vetores PP-p53 e mcDNA-p53 foi avaliada através do ensaio com resazurina. Células HeLa e Fibroblastos foram semeadas com uma densidade de  $10^4$  células/poço em placas de 96 poços e as transfecções foram realizadas durante 24, 36, 48 e 72 horas. Duas horas antes do final de cada tempo de transfecção, o meio de cultura foi descartado e foram adicionados 100  $\mu$ L de meio completo fresco e 20  $\mu$ L de resazurina 0,1% (m/v) a cada poço, incubando-se durante 4 horas no escuro, com as mesmas condições de cultura. Posteriormente, esta mistura reacional foi transferida para uma placa com fundo opaco. As leituras de fluorescência foram realizadas num espectrofluorímetro (SpectraMAX® Gemini™ EM, Molecular Devices, Estados Unidos da América), definindo dois comprimentos de onda diferentes, nomeadamente  $\lambda$ (excitação) = 544 nm e  $\lambda$ (emissão) = 590 nm, de modo a analisar a fluorescência da resorufina produzida. Células não-transfectadas foram utilizadas como controlo negativo e células tratadas com etanol 70% foram utilizadas como controlo positivo. Os ensaios foram realizados com um  $n = 4$  e a análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA, através do *software* GraphPad Prism (versão 6.01).

### **3.3.14. Avaliação da indução de apoptose - Kit de apoptose**

O processo de apoptose foi avaliado através da deteção da fragmentação do DNA celular, que ocorre devido à ativação de endonucleases. As células HeLa foram semeadas em placa de 96 poços, com uma densidade de  $10^4$  células/poço. Após 48 horas de transfecção, a placa foi centrifugada a 1000 g durante 3 minutos à temperatura ambiente. O meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído (PFA) durante 7 minutos. De seguida, a placa foi novamente centrifugada a 1000 g durante 3 minutos à temperatura ambiente, a solução fixadora foi descartada e as células foram lavadas com PBS. Posteriormente, foi realizada uma incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente com metanol 100%. A quantificação de células apoptóticas foi realizada através de

um método colorimétrico *in situ* (HT TiterTACS™ Assay Kit, Trevigen, Estados Unidos da América), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Posteriormente, os resultados foram obtidos através da leitura da placa a uma absorvância de 450 nm. Células não-transfectadas foram utilizadas como controlo negativo e células tratadas com uma solução-padrão de endonucleases fornecida pelo kit foram utilizadas como controlo positivo. Os ensaios foram realizados com um n = 3 e a análise estatística foi realizada com o teste *one-way* ANOVA, através do *software* GraphPad Prism (versão 6.01).

### 3.4. Construção do DNA minicircular multigénico

#### 3.4.1. Plasmídeos utilizados

O vetor PP-pri-miRNA-375 previamente construído pelo nosso grupo de investigação foi utilizado para a amplificação do gene pri-miRNA-375. Por sua vez, o vetor PP-p53 foi sujeito a mutagénese (NZYTech - Genes and Enzymes, Portugal) para que pudesse incluir os locais de reconhecimento das enzimas de restrição EcoRV e Scal. A amplificação destes dois vetores foi realizada através da fermentação bacteriana em *E. coli* ZYCY10P3S2T num orbital a 42°C e com agitação de 250 rpm, até atingir uma DO<sub>600nm</sub> de aproximadamente 5. Para a purificação de DNA plasmídico foi utilizado o kit NZYMiniprep (NZYTech - Genes and Enzymes, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 3.4.2. Amplificação por PCR

A técnica PCR foi realizada com o objetivo de amplificar o fragmento pri-miRNA-375. Para isto, foi adicionado 1 µL de PP-pri-miRNA-375, 6,25 µL de Taq polimerase, 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> e 0,4 µL de cada um dos *primers*, perfazendo com água até um volume final de 12,5 µL. As misturas reacionais foram colocadas num termociclador, programado com a seguinte sequência de incubações: 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 40 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 1 minuto a 72 °C, e por último, 5 minutos a 72 °C. Os *primers* utilizados foram desenhados especificamente para o fragmento pri-miRNA-375 e de forma a incluir as sequências de reconhecimento das respetivas enzimas nas extremidades do fragmento (FW: 5'- AAG ATA TCC GGG ACA AGC TCC AAG GC - 3'; RV: 5'- AAA GTA CTT TTC CAC CTC CAG AAG GGT T - 3'). Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% e o fragmento amplificado foi purificado com um kit de purificação de produtos de PCR (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey-Nagel, Alemanha).

### 3.4.3. Digestões enzimáticas

Para as digestões enzimáticas do fragmento pri-miRNA-375 e do PP-p53 mutado, foram utilizadas as enzimas de restrição Scal e EcoRV (Takara Bio, Estados Unidos da América). As digestões com EcoRV foram realizadas preparando uma mistura reacional com 1 µL desta enzima, 2 µL de 10X H Buffer e aproximadamente 500 ng de fragmento pri-miRNA-375 ou PP-p53 mutado, perfazendo com água até um volume final de 20 µL. A incubação foi realizada durante 2 horas a 37 °C num termociclador. As condições da enzima Scal foram otimizadas, realizando algumas alterações ao protocolo original. A desfosforilação do vetor foi realizada através da enzima fosfatase alcalina CIP (New England Biolabs, Estados Unidos da América), preparando uma mistura reacional com 1 µL desta enzima, 2 µL de tampão (NEB3) 10X e aproximadamente 500 ng de vetor completamente digerido, perfazendo com água até um volume final de 20 µL. Esta mistura foi incubada a 37 °C durante 1 hora. No final de todas as etapas, nomeadamente 1ª digestão, 2ª digestão e desfosforilação, os produtos foram sempre purificados com kit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit, Macherey-Nagel, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante e as amostras foram quantificadas com nanofotómetro. Todas as digestões foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 0,6%.

### 3.4.4. Etapa de clonagem

Para a etapa de clonagem, a concentração de vetor (digerido e desfosforilado) foi estabelecida para 100 ng e a concentração do fragmento foi variada para diferentes rácios, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{fragmento (ng)} = \frac{\text{vetor (ng)} \times \text{tamanho do fragmento (pb)}}{\text{tamanho do vetor (pb)}} \times \frac{\text{fragmento}}{\text{vetor}}$$

Vários rácios fragmento : vetor foram testados, tais como 1:1, 1:3, 3:1, 5:1, 9:1 e 10:1. As misturas reacionais foram preparadas em tubos de PCR pela adição de 1, 2 ou 3 µL de enzima T4 DNA Ligase (NZYTech - Genes and Enzymes, Portugal) e a quantidade de tampão 10X correspondente ao dobro da quantidade de enzima utilizada. Também foram adicionados 100 ng de vetor e a quantidade de fragmento calculada através da equação anterior, perfazendo com água até um volume final de 20 µL. Estas misturas reacionais foram incubadas durante 18 horas a temperaturas diferentes, tais como temperatura ambiente, 4 °C, 18 °C e 20 °C. Por último, foi realizada a transformação de células *E. coli* competentes.

### 3.4.5. Preparação de células *E. coli* competentes

A preparação de células *E. coli* competentes foi realizada de acordo com o método descrito por Inoue, baseado num crescimento lento da cultura bacteriana por indução de stress térmico, através da diminuição da temperatura de crescimento [76]. Assim, as estirpes *E. coli* TOP10 e ZYCY10P3S2T foram inoculadas em placas de LB-agar e incubadas durante 18 horas a 37 °C. Cada colónia isolada foi transferida para 25 mL de meio SOB (2% (m/v) triptona, 0,5% (m/v) de extrato de levedura, 8,56 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 10 mM MgSO<sub>4</sub>), num *erlenmeyer* de 250 mL. Esta mistura foi incubada durante 6 horas a 37 °C, com agitação de 250 rpm. Posteriormente, estas culturas iniciais foram utilizadas para inocular 3 *erlenmeyers* de 250 mL, cada um com 62,5 mL de meio SOB. Deste modo, para a estirpe *E. coli* TOP10 foram transferidos 100 µL, 50 µL e 25 µL, enquanto que para a estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T foram transferidos 25 µL, 10 µL e 5 µL de cultura inicial. Todos os *erlenmeyers* foram incubados *overnight* a 20 °C, com agitação de 250 rpm. A DO<sub>600nm</sub> foi monitorizada até um dos *erlenmeyers* atingir um valor de aproximadamente 0,55, sendo este transferido para um banho frio durante 10 minutos e descartando as restantes culturas. As células foram recolhidas por centrifugação a 2500 g durante 10 minutos a 4 °C, descartando o meio de cultura. De seguida, as células foram ressuspensas em 20 mL de ITB (*Inoue Transformation Buffer*) gelado, constituído por 55 mM MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 15 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 250 mM KCl, 10 mM PIPES (0,5 M com pH 6,7). As células foram novamente recolhidas por centrifugação a 2500 g durante 10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 5 mL de ITB gelado. Posteriormente, foram adicionados 357 µL de DMSO e a suspensão bacteriana foi cuidadosamente homogeneizada e colocada em gelo durante 10 minutos. Por último, foram transferidos 100 µL da suspensão celular para tubos estéreis frios, sendo as células competentes rapidamente congeladas, submergindo os tubos em azoto líquido, e foram armazenadas a -80 °C.

### 3.4.6. Transformação de células *E. coli* competentes

Células *E. coli* competentes foram transformadas por choque térmico. As misturas reacionais provenientes da clonagem foram adicionadas a alíquotas de 100 µL de células *E. coli* competentes TOP10 ou ZYCY10P3S2T, incubando durante 30 minutos no gelo. Em paralelo foi realizado o mesmo procedimento, mas com o PP-p53 mutado (sem passar pelo processo de clonagem) como controlo positivo da eficiência das células competentes. De seguida, o choque térmico foi promovido a 42 °C durante 45 segundos, seguindo-se uma incubação durante 2 minutos no gelo. A esta mistura foram adicionados 400 µL de meio SOB e incubou-se num orbital a 37 °C durante 1 hora, com agitação de 250 rpm. Finalmente, foram transferidos 250 µL desta cultura bacteriana para placas LB-agar contendo canamicina (50 µg/mL), seguindo-se uma incubação *overnight* a 37 °C.

### 3.4.7. Análise de colônias bacterianas através de PCR

Quando necessário, colônias bacterianas isoladas foram repicadas para uma outra placa de LB-agar contendo canamicina (50 µg/mL) e ressuspensas em 10 µL de 0,02 M NaOH. Posteriormente, foram incubadas a 100 °C durante 5 minutos e foram transferidos 2 µL desta mistura para a reação de PCR. Foram utilizados *primers* específicos para o gene pri-miRNA-375, o gene GFP e o gene p53, como indicado na Tabela 7. Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 7: *Primers* utilizados para os genes GFP, pri-miRNA-375 e p53.

pri-miRNA-375	FW	5' - AAG ATA TCC GGG ACA AGC TCC AAG GC - 3'
	RV	5' - AAA GTA CTT TTC CAC CTC CAG AAG GGT T - 3'
GFP	FW	5' - ATG GAG AGC GAC GAG AGC GG - 3'
	RV	5' - TTA GCG AGA TCC GGT GGA GC - 3'
p53	FW	5' - AAT CTA GAA TGG AGG AGC CGC AGT CAG - 3'
	RV	5' -ATG GAT CCT CAG TCT GAG TCA GGC CCT TC - 3'

### 3.4.8. Estudo preliminar de transfecção com o vetor de PP multigênico

Para avaliar a funcionalidade do vetor de PP multigênico, realizou-se um estudo de transfecção *in vitro* com células CaSki, semeadas com uma densidade de  $2,4 \times 10^5$  células/poço numa placa de 12 poços. Após 24 horas de transfecção com o vetor de PP multigênico, células não-transfectadas e transfectadas foram submetidas à extração de RNA, e de seguida foi realizada a síntese de cDNA. Posteriormente, foram avaliados os níveis de transcritos do gene p53 e dos oncogenes E6 e E7 por RT-PCR, utilizando *primers* desenhados especificamente para cada um destes, como indicado na Tabela 8. Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 8: *Primers* utilizados para os transcritos dos genes p53, E6 e E7.

p53	FW	5' - CCT CAC CAT CAT CAC ACT GG - 3'
	RV	5' - CCT CAT TCA GCT CTC GGA AC - 3'
E6	FW	5' - CAG GAG CGA AGA AAG CCC TT - 3'
	RV	5' - ATA GTC TAC CAG CTC ACG TCG T - 3'
E7	FW	5' - TCC ACA AGC AGC TGG ACC GGA - 3'
	RV	5' - GCA CAC AAT TCC TGT TAG GCC CAT - 3'

# Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Atualmente não existem tratamentos eficientes, não invasivos e direcionados para a infecção por HPV, existindo milhões de mulheres em todo o mundo infetadas por este vírus sob risco eminente de progredir para uma situação de cancro do colo do útero. Surge assim uma grande necessidade de encontrar novos tratamentos que consigam não só prevenir a infecção, mas principalmente controlar ou eliminar este cancro. As terapias baseadas em DNA têm sido consideradas como uma estratégia promissora para o tratamento de inúmeras doenças, como é o caso do cancro, existindo casos de sucesso da aplicação do vetor não-viral de DNA plasmídico. Contudo, a possibilidade de utilizar um vetor mais seguro, devido à ausência de sequências bacterianas, e que aumente a eficiência de transfecção devido ao seu tamanho relativamente reduzido, torna o vetor de mcDNA numa alternativa promissora.

Deste modo, o presente trabalho consistiu, numa primeira fase, na produção e purificação dos vetores de PP e mcDNA, que codificam para o gene supressor de tumor p53. Posteriormente, foram realizados estudos de transfecção *in vitro* com células cancerígenas do colo do útero, de modo a avaliar a eficiência de transfecção e o efeito terapêutico do gene codificado nestes vetores. Numa segunda fase do trabalho, foi também realizada a construção de um mcDNA multigénico, com clonagem de dois genes terapêuticos no PP, nomeadamente com o gene p53 e o gene pri-miRNA-375 visando uma potencial aplicação terapêutica combinada.

## 4.1. Purificação

De modo a ser possível aplicar o vetor de mcDNA-p53 em abordagens terapêuticas, torna-se necessário purificar a isoforma biologicamente ativa (sc). No entanto, as metodologias atuais estabelecidas para a purificação do DNA plasmídico não são diretamente aplicáveis à purificação do mcDNA, isto porque os contaminantes de PP e mP são muito semelhantes em termos de tamanho e topologia molecular, tornando-se necessário ajustar ou desenvolver novas metodologias de purificação. Deste modo, o presente trabalho explorou duas estratégias de purificação para o mcDNA-p53, nomeadamente a cromatografia de afinidade e a cromatografia de filtração em gel.

### 4.1.1. Purificação do mcDNA-p53 através de cromatografia de afinidade

Para a purificação do mcDNA-p53 através de estratégias de cromatografia de afinidade, foram testados dois monolitos modificados com ligandos baseados em histidina que já tinham sido previamente explorados para a purificação de DNA plasmídico [62], nomeadamente o monolito de 1-benzil-L-histidina e o monolito de L-histidina.

#### 4.1.1.1. Monolito de 1-benzil-L-histidina

Com o objetivo de promover a separação do mcDNA-p53, começou-se por utilizar o monolito modificado com o ligando 1-benzil-L-histidina, utilizando as condições cromatográficas otimizadas no recente estudo de purificação de DNA plasmídico com este mesmo ligando [62].

Desta forma, o monolito de 1-benzil-L-histidina (volume de coluna = 0,1 mL) foi equilibrado com 1,65 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0), utilizando um caudal de 1 mL/min e foram injetados 100  $\mu\text{L}$  da amostra de lisado possuindo já uma elevada força iónica. Após a eluição no *flowthrough* das biomoléculas que não sofreram interação com a coluna, dando origem ao 1º pico, o 2º pico foi obtido através da diminuição da força iónica para 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0) no tampão de eluição, de modo a obter as restantes biomoléculas que ficaram previamente retidas. As frações foram recolhidas e analisadas em gel de agarose 0,8% (Figura 17).

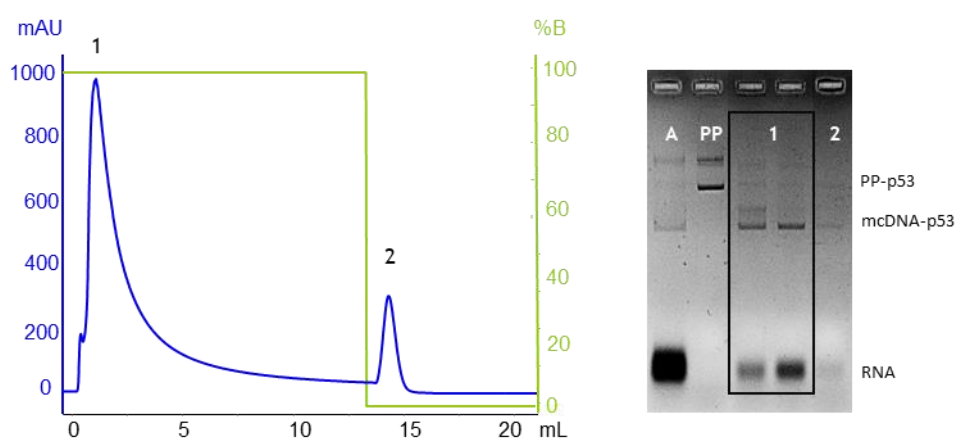


Figura 17: Perfil cromatográfico da amostra de lisado injetada no monolito de 1-benzil-L-histidina, utilizando um gradiente com dois passos, nomeadamente 1,65 M e 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0). Encontra-se também representada a respetiva eletroforese em gel de agarose: A - Amostra de lisado; PP - Amostra de PP-p53; 1,2 - Respetivos picos cromatográficos.

Através da Figura 17 verifica-se que o mcDNA-p53 elui em ambos os picos, juntamente com as impurezas de PP-p53 e RNA. Os resultados obtidos sugerem que o ligando de 1-benzil-L-histidina apresenta pouca seletividade para isolar o mcDNA-p53, sendo também o resultado que se verificou para a purificação do DNA plasmídico [62]. Este comportamento pode ser explicado pelo facto do ligando 1-benzil-L-histidina, para além do anel de imidazol, também apresentar um anel de benzeno que lhe confere uma hidrofobicidade adicional. Embora não seja necessário usar elevadas concentrações de sulfato de amónio para promover retenção da biomolécula alvo, promove interações fortes com os vários ácidos nucleicos presentes na amostra, dificultando assim a eluição seletiva das biomoléculas que ficaram previamente retidas [62]. De acordo com estas considerações, foi posteriormente explorado um monolito modificado com o ligando de L-histidina.

#### 4.1.1.2. Monolito de L-histidina

O monolito de L-histidina (volume de coluna = 0,1 mL) foi utilizado com o objetivo de promover a separação do mcDNA-p53, uma vez que foi anteriormente comprovado que este possui a capacidade de reconhecer e isolar a isoforma sc do DNA plasmídico a partir de amostras pré-purificadas [77] e de lisados [62].

O aminoácido L-histidina apresenta um papel versátil na purificação de DNA plasmídico, uma vez que possui um anel imidazol responsivo ao pH que altera a sua hidrofobicidade e densidade de carga. Assim, o pH influencia o reconhecimento do DNA plasmídico devido à presença deste grupo ionizável que apresenta um  $pK_a = 6,5$  [78]. Primeiramente, foram avaliados os tempos de retenção de cada biomolécula isolada, nomeadamente PP-p53, mcDNA-p53 e RNA, aplicando um gradiente linear desde 3 M a 0 M de  $(NH_4)_2SO_4$  durante 40 minutos (caudal de 1 mL/min e injeção de 100  $\mu$ L de amostra), para avaliar a influência do tampão a pH 5,0 e pH 8,0. Os resultados estão representados na Tabela 9.

Tabela 9: Tempos de retenção de cada biomolécula isolada no monolito de L-histidina.

	Tempos de retenção (min)	
	pH 5,0	pH 8,0
PP-p53	14,15	8,26
mcDNA-p53	8,05	7,80
RNA	10,86	9,46

Através da Tabela 9 podemos verificar que o mcDNA-p53 é o ácido nucleico com menor tempo de retenção tanto a pH 5,0 como a pH 8,0. Verifica-se também que nos ensaios a pH 8,0, os tempos de retenção das diferentes espécies são muito mais próximos quando comparados com os tempos de retenção dos ensaios a pH 5,0. Estes resultados sugerem que existe um aumento da seletividade quando se utiliza um pH ácido, provavelmente devido ao anel imidazol deste ligando se encontrar carregado positivamente a pH 5,0. Nestas condições, o mecanismo de ligação entre o ligando L-histidina e os diversos ácidos nucleicos envolve não só interações hidrofóbicas devido à presença de sulfato de amónio, como também interações electroestáticas e interações catião- $\pi$  entre o aminoácido carregado positivamente e os grupos fosfato ou os anéis aromáticos das bases dos ácidos nucleicos, respetivamente [78].

Assim, como os tempos de retenção das impurezas (PP-p53 e RNA) a pH 5,0 são mais distantes do tempo de retenção do mcDNA-p53, torna-se mais promissor explorar uma estratégia de purificação mantendo o pH 5,0 dos tampões cromatográficos.

Inicialmente foram preparadas amostras pré-purificadas contendo somente PP-p53 e mcDNA-p53, para realizar um *screening* das concentrações de sulfato de amônio na etapa de ligação e avaliar até quando existiria interação destas duas biomoléculas com o monolito modificado com L-histidina, e qual seria a primeira a eluir. Deste modo, o monolito foi equilibrado a 1 mL/min com diferentes percentagens da solução de equilíbrio 3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0), injetando posteriormente 100 µL de amostra pré-purificada com a força iônica devidamente ajustada. O passo de eluição foi sempre realizado com a diminuição da força iônica para 0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0). As frações cromatográficas foram recolhidas e analisadas em gel de agarose 0,8% (Figura 18 e Tabela 10).

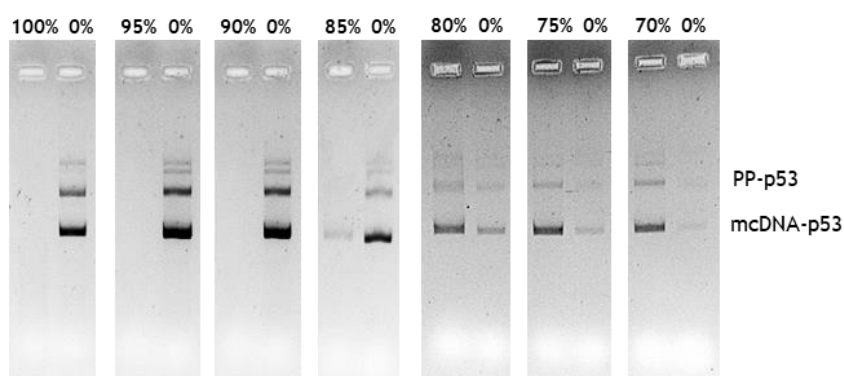


Figura 18: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos obtidos nos ensaios de *screening*, utilizando um gradiente decrescente com dois passos, começando com variação da percentagem de 100%-70% do tampão de ligação com 3 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e mantendo a eluição a 0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Tabela 10: Comparação entre a presença de PP-p53 e mcDNA-p53 no 1º pico cromatográfico, de acordo com as diferentes percentagens de equilíbrio testadas. Os símbolos representam a ausência (-) e a presença (+) da biomolécula indicada.

	100%	95%	90%	85%	80%	75%	70%
PP-p53	-	-	-	-	+	++	+++
mcDNA-p53	-	-	-	+	++	+++	+++

Pela análise simultânea da Figura 18 e da Tabela 10, verifica-se que nos ensaios com equilíbrio até 90% todas as moléculas ficam retidas após injeção. Com equilíbrio a 85%, alguma quantidade de mcDNA-p53 que não interage com a coluna é obtida no passo de ligação. No ensaio realizado a 80% começa a haver eluição tanto de mcDNA-p53 como de PP-p53 no passo de ligação, sendo que no ensaio a 70% quase não existe retenção das biomoléculas na coluna.

Através destes ensaios cromatográficos, continua a verificar-se a tendência do mcDNA-p53 em eluir primeiro que o PP-p53, o que está de acordo com os tempos de retenção anteriormente avaliados. Para além disto, a ordem de eluição das espécies depende da densidade de carga e do tamanho das biomoléculas [69]. Deste modo, a sequência de eluição descrita nestas estratégias de purificação também vai de encontro com este princípio, uma vez que o mcDNA-p53 elui primeiro que o PP-p53, o que pode ser justificado pelo tamanho e a carga que estas biomoléculas apresentam. De facto, o mcDNA-p53 possui um tamanho molecular inferior, apresentando menor número global de cargas negativas e, conseqüentemente, menor número de pontos de interação com a coluna monolítica.

De seguida, realizou-se um *screening* entre as concentrações de 85% e 80%, o intervalo que apresentou potencial para a separação de PP-p53 e mcDNA-p53 (Figura 19).

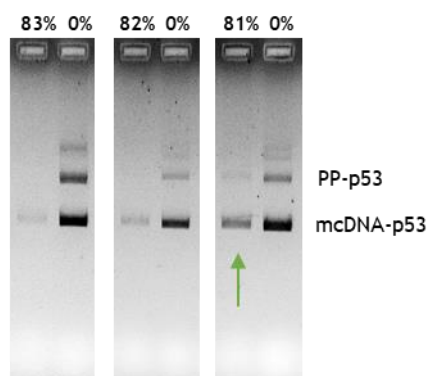


Figura 19: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos obtidos nos ensaios de *screening*, utilizando um gradiente decrescente com dois passos, começando com variação da percentagem de 83%-81% do tampão de ligação com 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e mantendo a eluição a 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A seta a verde representa a melhor condição encontrada.

Através da análise da Figura 19 podemos inferir que a concentração de equilíbrio de 81% permitiu isolar maior quantidade de mcDNA-p53, praticamente sem contaminação de PP-p53. Concentrações de ligação inferiores a 81% poderão aumentar a quantidade de mcDNA-p53, mas também comprometer a sua pureza. Contudo, a recuperação de mcDNA-p53 no ensaio de 81% não é muito satisfatória, uma vez que a maioria fica retida na coluna e sofre co-eluição com o PP-p53 no 2º pico cromatográfico, sendo necessário explorar outras estratégias de purificação.

Continuando a utilizar amostras pré-purificadas de PP-p53 e mcDNA-p53, foi avaliada a influência da ligação efetiva da amostra a 100% e posterior separação das espécies em dois passos de eluição. Isto é, o objetivo consiste em tentar reter todas as biomoléculas no passo de ligação, eluir o mcDNA-p53 por diminuição ligeira da força iónica e, por último, eluir o PP-p53 novamente por diminuição da força iónica. Nestes ensaios, o monolito foi sempre equilibrado com 100% de solução 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0), injetando posteriormente 100  $\mu\text{L}$  de amostra pré-purificada com a força iónica ajustada. Após a etapa de ligação a 100%, explorou-se a diminuição da força iónica para uma percentagem intermediária até se verificar

eluição da biomolécula de interesse, e por último, realizou-se a eluição total diminuindo a força iônica para 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . As frações foram recolhidas e analisadas em gel de agarose 0,8% (Figura 20).

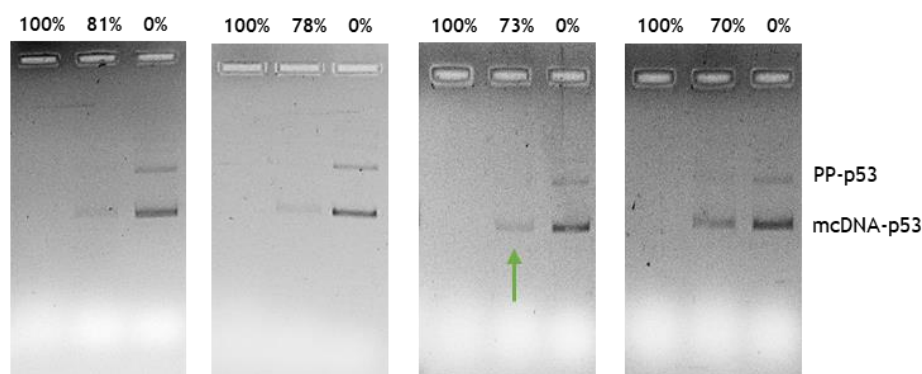


Figura 20: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos, utilizando um gradiente decrescente com três passos (3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - concentração intermediária - 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). A seta a verde representa a melhor condição encontrada.

A primeira percentagem intermediária selecionada para o passo de eluição foi de 81%, uma vez que foi esta condição que permitiu obter os melhores resultados na estratégia anterior sem ligação efetiva. Os resultados representados na Figura 20 mostram que 81% não é suficiente para promover eluição do mcDNA-p53, ficando maior parte retido e sendo somente eluído com 0% de sulfato de amônio. Desta forma, é possível verificar que existem alterações do perfil cromatográfico em comparação com o ensaio em que o equilíbrio é realizado com 81%. Estes resultados sugerem que é promovida uma interação mais forte entre as biomoléculas e a coluna quando é realizada uma ligação efetiva a 100%, sendo necessárias condições mais drásticas (diminuir mais a força iônica) para enfraquecer as interações que foram estabelecidas e obter a eluição pretendida. Neste caso, pode concluir-se que 73% mostrou ser a percentagem intermediária adequada para recuperar o mcDNA-p53 sem comprometer a sua pureza. A estratégia de realizar o equilíbrio a 100% parece melhorar a recuperação do mcDNA-p53 em relação aos ensaios anteriores de ligação não-efetiva, no entanto esta ainda não é satisfatória, eluindo uma grande quantidade de mcDNA-p53 no último passo cromatográfico.

De modo a tentar melhorar a separação entre PP-p53 e mcDNA-p53, foi realizado um ensaio com o objetivo de adicionar o efeito da manipulação do pH ao efeito da força iônica. Assim, o monolito foi equilibrado com 100% de solução 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10mM citrato-EDTA (pH 5,0), injetando posteriormente 100  $\mu\text{L}$  de amostra pré-purificada com a força iônica acertada. Após a etapa de equilíbrio, estabeleceu-se um gradiente linear durante 10 minutos, diminuindo a força iônica até 73% de solução 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10mM Tris-EDTA (pH 8,0). Por último, realizou-se a eluição das restantes biomoléculas com a diminuição da força iônica para 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM Tris-EDTA (pH 8,0). As frações cromatográficas foram recolhidas e analisadas em gel de agarose 0,8% (Figura 21).

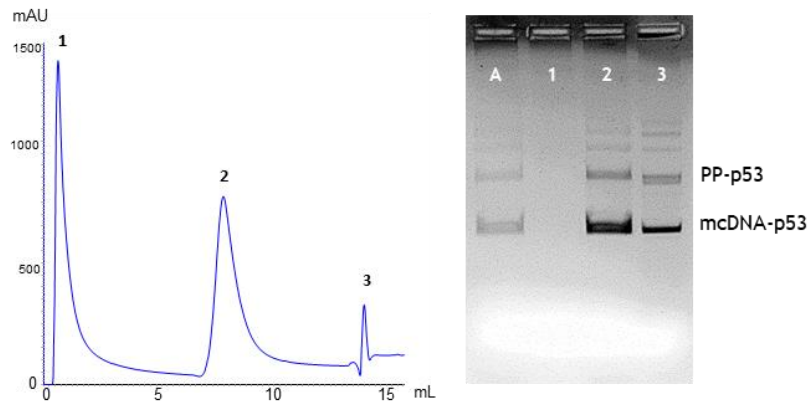


Figura 21: Perfil cromatográfico do equilíbrio com 100% de solução 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0) (1), gradiente linear durante 10 minutos até 73% de solução 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM Tris-EDTA (pH 8,0) (2) e eluição das restantes biomoléculas com 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM Tris-EDTA (pH 8,0) (3). Encontra-se também representada a respetiva eletroforese em gel de agarose: A - Amostra pré-purificada; 1,2,3 - Respetivos picos cromatográficos.

Pelos resultados apresentados na Figura 21, é possível verificar que ao aumentar o pH de 5,0 para 8,0 juntamente com a diminuição da força iónica, obteve-se uma recuperação de mcDNA-p53 no 2º pico superior relativamente ao ensaio anterior sem mudança de pH, no entanto também existe uma maior contaminação com PP-p53. Tal como era esperado, o aumento do pH enfraqueceu as interações e, conseqüentemente, diminuiu a retenção do mcDNA-p53, no entanto essa influência também se refletiu no PP-p53. Este comportamento pode ser explicado pelo facto de ambas as moléculas de PP-p53 e mcDNA-p53 serem muito semelhantes em termos de tamanho e topologia molecular [79].

Posteriormente, foi realizada uma comparação entre a coluna monolítica (volume de coluna = 0,1 mL) e uma coluna convencional de L-histidina-agarose (volume de coluna = 2 mL). Estes ensaios tiveram como objetivo analisar se existiria alguma influência da forma estrutural da matriz, assim como se existiria alguma influência do tamanho da coluna, que pudesse ajudar na separação. De modo a realizar esta comparação, foram repetidos os ensaios de equilíbrio a 100%, diminuição da força iónica para 73% ou para 70%, e eluição das restantes biomoléculas com 0% na coluna convencional (caudal de 1 mL/min e injeção de 100  $\mu\text{L}$  de amostra). As frações foram recolhidas e analisadas em gel de agarose 0,8% (Figura 22).

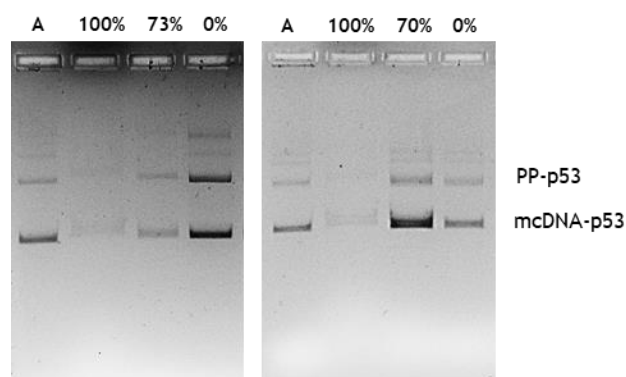


Figura 22: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos, utilizando uma coluna convencional de L-histidina-agarose. Equilíbrio realizado com 100% de solução 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0), passo de concentração intermediária (73% ou 70%) e eluição das restantes biomoléculas com 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0).

Através da Figura 22 verifica-se que o comportamento da coluna convencional é muito idêntico ao do suporte monolítico, havendo tendência para co-eluição do mcDNA-p53 e PP-p53 nas mesmas condições de força iónica. Este comportamento pode ser uma vez mais relacionado com o facto de o PP-p53 e o mcDNA-p53 serem muito semelhantes em termos de tamanho e conteúdo de bases [79]. Além disso, utilizar uma coluna convencional onde a transferência de massa ocorre por difusão (ao contrário do monólito que ocorre por convecção) e com maior volume, não alterou o comportamento de separação entre as duas biomoléculas.

Desta forma, voltou-se a usar o monólito de L-histidina para aplicar amostras complexas de lisado contendo PP-p53, mcDNA-p53 e RNA, de modo a perceber a influência da presença desta última biomolécula no processo de separação. A concentração total de ácidos nucleicos presente nas amostras injetadas foi de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (1º ensaio), 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (2º ensaio) e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (3º ensaio), como representado na Figura 23.

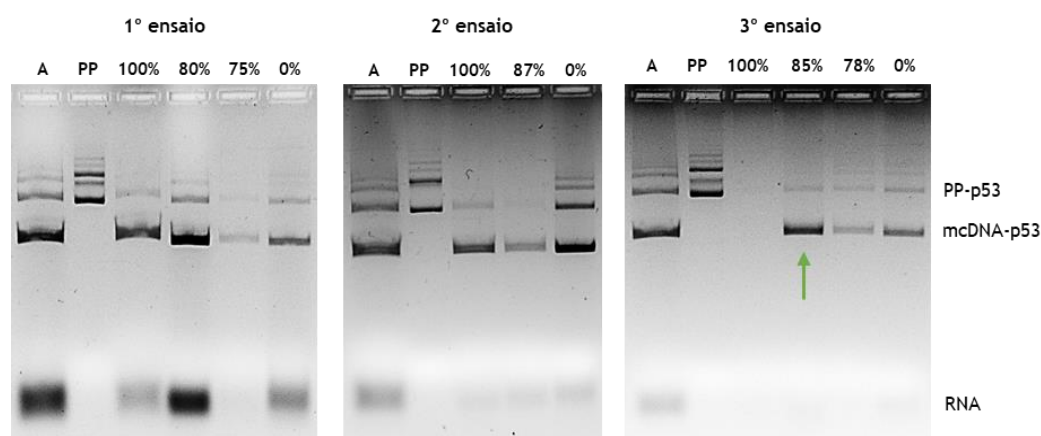


Figura 23: Eletroforeses em gel de agarose dos picos cromatográficos obtidos nos três ensaios com amostras complexas de lisado, utilizando gradientes decrescentes por passos da solução 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0). A - Amostra complexa de lisado; PP - Amostra de PP-p53. A seta a verde representa a melhor condição encontrada.

Através dos três ensaios representados na Figura 23, foi possível verificar que a concentração de amostra inicial que é injetada no sistema cromatográfico tem uma grande influência no perfil de eluição. Deste modo, no 1º ensaio verificou-se que parte da amostra injetada eluiu logo no *flowthrough*, durante o passo de ligação a 100%, sugerindo assim que foi excedida a capacidade de ligação da coluna monolítica (não havendo ligandos disponíveis para reter todas as moléculas presentes na amostra injetada) devido à amostra se encontrar muito concentrada [58]. No 2º ensaio observou-se que a diluição da amostra inicial diminuiu a quantidade de moléculas a eluírem durante o passo de ligação a 100%, sendo necessário diluir um pouco mais a amostra inicial. Por sua vez, no 3º ensaio verifica-se que todas as moléculas ficaram retidas durante a etapa de ligação a 100%. Deste modo, a concentração de 1000 µg/mL mostrou ser a mais indicada para ensaios cromatográficos utilizando amostras de lisado complexas (contendo RNA).

Por outro lado, parece que existe uma pequena alteração do comportamento cromatográfico com a inclusão de RNA na amostra, dado que a molécula de interesse começa a eluir a concentrações de sulfato de amónio superiores (acima dos 80%) em comparação com os ensaios de amostras pré-purificadas. Este resultado sugere que a presença de RNA diminui a força de interação estabelecida entre o mcDNA-p53 e o monolito de L-histidina, sendo facilmente destabilizada por pequenas diminuições da força iónica. Estes resultados indicam que as interações estabelecidas com a coluna são mais fracas na amostra complexa quando comparadas com as interações estabelecidas utilizando amostras simples.

Concluindo, a melhor estratégia de purificação encontrada foi utilizando o monolito modificado com L-histidina, e uma amostra complexa de lisado, realizando um passo de ligação de 100% de 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0), seguido da diminuição da força iónica para 85%, 78% e 0%. Esta estratégia permitiu recuperar grande parte da isoforma sc do mcDNA-p53 no 2º pico cromatográfico (85%), contendo apenas vestígios de PP-p53. Ainda assim, alguma quantidade considerável de mcDNA-p53 é perdida nos restantes picos. Estes resultados ainda não são totalmente satisfatórios para a aplicação do mcDNA-p53 em futuros estudos *in vitro*, sendo necessário encontrar novas estratégias de purificação.

#### 4.1.2. Purificação do mcDNA-p53 através de cromatografia de filtração em gel

Foi explorada outra estratégia de purificação do mcDNA-p53 através de cromatografia de filtração em gel, de modo a promover a separação do PP-p53, mcDNA-p53 e RNA, tendo em consideração as diferenças de tamanho molecular. Para isto, foi utilizada coluna Sephacryl S-1000 SF (volume de coluna = 106 mL). O equilíbrio desta coluna foi promovido com uma solução 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl (pH 7,0) e o ensaio foi realizado com um caudal de 0,3 mL/min, após a injeção de 2 mL de amostra de lisado proveniente da lise alcalina modificada. Foram recolhidas frações de 4 mL ao longo do tempo e estas foram analisadas em gel de agarose 0,8% (Figura 24).

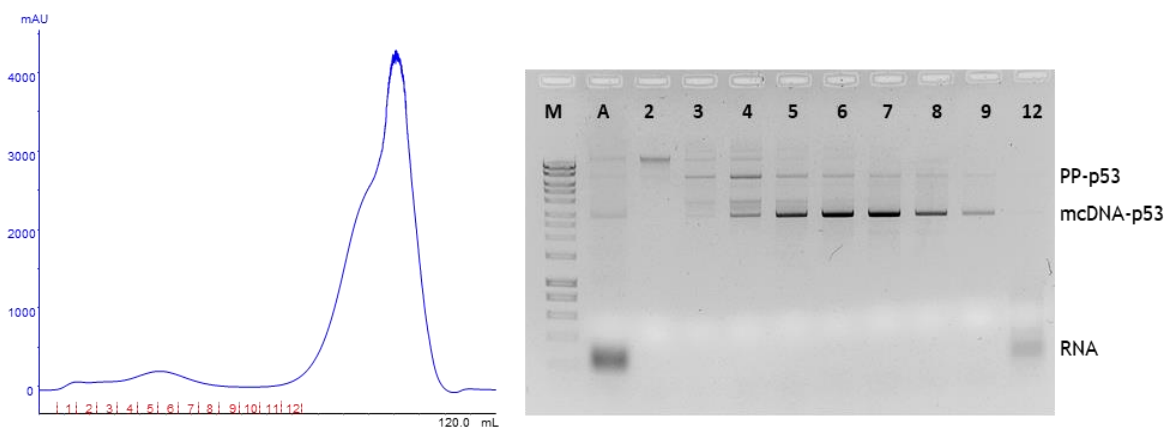


Figura 24: Perfil cromatográfico da amostra de lisado injetada na coluna Sephacryl S-1000 SF e respetiva eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas ao longo do tempo. M - Marcador de peso molecular; A- Amostra inicial de lisado.

Através da Figura 24, podemos verificar que as moléculas eluem de acordo com o seu peso molecular, isto é, começam por eluir as moléculas de maior tamanho como o DNA genómico (principalmente na fração 2), de seguida o PP-p53 (maioritariamente nas frações 3 e 4), seguido do mcDNA-p53 (em maior quantidade nas frações 5 a 8), e por último o RNA (a partir da fração 12). Esta estratégia de purificação apresenta a vantagem de permitir uma separação efetiva entre o RNA e as restantes biomoléculas, para além de promover a remoção do sal das amostras. Por último, foram selecionadas as frações que possuíam maior quantidade de mcDNA-p53 e menor quantidade de PP-p53 (6 à 9), para posteriormente avaliar o grau de pureza relativa e, eventualmente, serem utilizadas nos estudos *in vitro*.

### 4.1.3. Análise das amostras purificadas - Densitometria de bandas

Com o objetivo de selecionar as amostras a serem utilizadas nos estudos *in vitro*, obtidas pelas estratégias cromatográficas de afinidade e filtração em gel, foi avaliada a pureza relativa por densitometria de bandas. Na Figura 25 encontram-se representadas as eletroforeses em gel de agarose de frações de mcDNA-p53 purificadas através de cromatografia de afinidade (A) e através de cromatografia de exclusão molecular (B). Encontram-se também representados os respectivos picos gaussianos obtidos por densitometria de bandas com o *software* ImageJ.

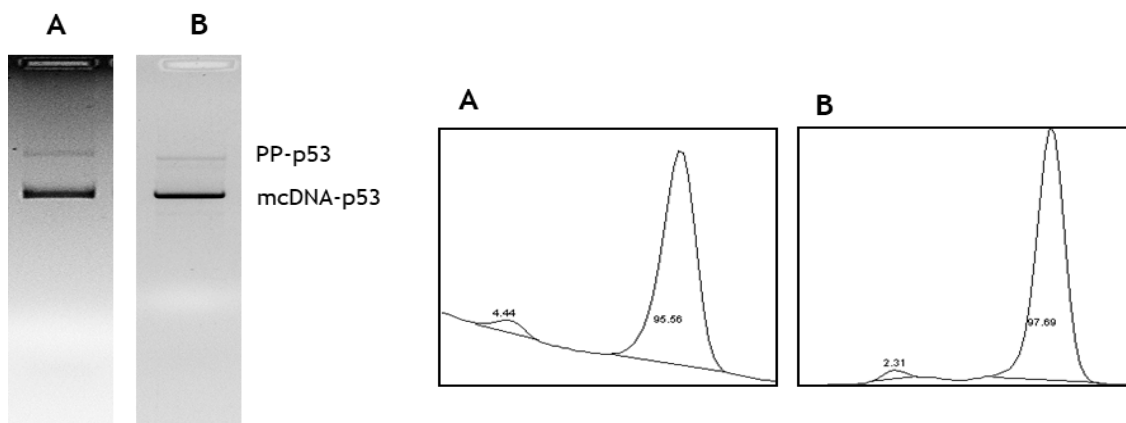


Figura 25: Eletroforeses em gel de agarose de frações purificadas de mcDNA-p53 e respectivos picos gaussianos obtidos por densitometria de bandas. Resultados correspondentes a frações purificadas através de cromatografia de afinidade (A) e através de cromatografia de filtração em gel (B).

Através da densitometria de bandas podemos avaliar a pureza relativa entre as amostras, comparando a razão existente entre PP-p53 e mcDNA-p53. A fração purificada através de cromatografia de afinidade corresponde ao 2º pico cromatográfico obtido com o monolito de L-histidina, através do ensaio com a etapa de ligação a 100% de 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0), seguido da diminuição da força iônica para 85%, 78% e 0%. A fração purificada através de cromatografia de filtração em gel corresponde à Fração 7 do ensaio com a coluna Sephacryl S-1000 SF, equilibrada com 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl (pH 7,0).

Através da Figura 25 podemos verificar que a fração purificada por cromatografia de afinidade apresenta uma percentagem relativa de 4,44% de PP-p53 e 95,56% de mcDNA-p53. Por outro lado, a fração recuperada por cromatografia de filtração em gel apresenta uma percentagem relativa de 2,31% de PP-p53 e 97,69% de mcDNA-p53. Através destes resultados podemos inferir que a amostra B possui menor contaminação por PP-p53, apesar de o grau de pureza relativa entre as duas frações purificadas não ser muito diferente. No entanto, a coluna de filtração em gel permite aplicar e recuperar maior quantidade de mcDNA-p53 por cada ensaio cromatográfico, assim como também garantimos que não há presença de RNA na amostra. Deste modo, as frações purificadas através de cromatografia de filtração em gel foram utilizadas em todos os estudos de transfecção *in vitro* que se seguem.

## 4.2. Estudos de transfecção *in vitro*

A aplicação de um biofármaco que restabeleça os níveis de proteína p53 pode ser uma potencial vertente de terapia génica para o tratamento do cancro do colo do útero. Para a terapia génica ser bem-sucedida, é necessário que exista uma entrega eficaz da nova informação genética às células cancerígenas do colo do útero, com o objetivo de restaurar os processos celulares normais.

Deste modo, os estudos de transfecção *in vitro* com células HeLa foram realizados através da utilização dos vetores PP-p53 e mcDNA-p53, pré-purificados através de um kit comercial e uma coluna cromatográfica de filtração em gel, respetivamente. Estes tiveram como objetivo verificar a internalização celular e avaliar a eficiência de transfecção destes vetores. Para além disto, foi confirmada a transcrição do gene de interesse e detetada a tradução na respetiva proteína alvo, assim como foi realizada a sua quantificação. Por último, de modo a avaliar a ação terapêutica do gene supressor de tumor p53 codificado nestes vetores, foram realizados ensaios de proliferação celular, citotoxicidade e apoptose.

### 4.2.1. Internalização celular - *Live Cell Imaging*

Foi realizada a aquisição de imagens em tempo real, de modo a acompanhar a entrada dos vetores de DNA marcados com FITC no núcleo de células HeLa. Este método teve como objetivo verificar a internalização celular dos dois vetores de DNA, ou seja, verificar se estes possuíam a capacidade de atravessar a membrana celular e entrar no núcleo, onde o gene codificado no DNA plasmídico pode ser corretamente transcrito. A Figura 26 representa a vista ortogonal de imagens de fluorescência obtidas através de células HeLa transfectadas com PP-p53 e mcDNA-p53 marcados com FITC.

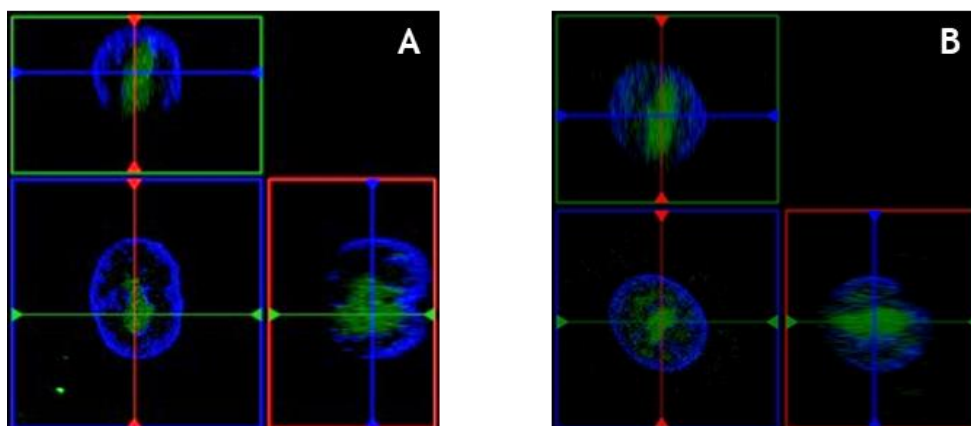


Figura 26: Vista ortogonal de células HeLa transfectadas com os dois vetores de DNA marcados com FITC. (A) Células transfectadas com PP-p53; (B) Células transfectadas com mcDNA-p53. O núcleo das células está representado a azul e os vetores de DNA marcados com FITC estão representados a verde.

Pelos resultados apresentados na Figura 26, pode verificar-se que ambos os vetores marcados com FITC (verde) foram capazes de atravessar a membrana celular e entrar no núcleo (azul). Além disso, com o decorrer do tempo, foi possível verificar que o mcDNA-p53 conseguiu entrar no núcleo da primeira célula (presente no campo de focagem escolhido) após 60 minutos do início da transfecção, enquanto que o PP-p53 só conseguiu entrar após 100 minutos do início da transfecção.

É possível inferir que as células foram transfectadas com sucesso com ambos os vetores, mas os resultados sugerem que o mcDNA-p53 apresenta maior eficiência de transfecção quando comparado com o PP-p53. Este comportamento ocorre provavelmente devido ao facto de o mcDNA-p53 apresentar um tamanho mais reduzido, facilitando a sua passagem pela membrana celular e a entrada no núcleo das células. Estes resultados estão de acordo com as vantagens apresentadas para o vetor de mcDNA [67].

Em estudos anteriores nos quais também foram utilizados vetores de mcDNA, foi demonstrado que a remoção das sequências bacterianas, com a consequente diminuição do tamanho do vetor, tem um impacto significativo no aumento da eficiência de transfecção. Nestes estudos foram realizadas comparações diretas entre o vetor de PP e o seu correspondente mcDNA [80] e comparações entre moléculas de DNA circular com diferentes tamanhos [81]. Todas estas evidências estão de acordo com o facto de que o tamanho do vetor de DNA plasmídico modula a eficiência de transfecção, estando estes parâmetros inversamente relacionados [82, 83].

#### **4.2.2. Eficiência de transfecção - Microscopia de Fluorescência**

Para comparar a eficiência de transfecção entre PP-p53 e mcDNA-p53, foram realizados estudos com diferentes *end-points* de transfecção. Para tal, os vetores foram novamente marcados com FITC e foram adquiridas imagens de células não-transfectadas (controlo) e células transfectadas durante 1, 2 e 6 horas (Figura 27). Foi também realizada a representação gráfica destes resultados relativamente à intensidade de fluorescência média do FITC (Figura 28).

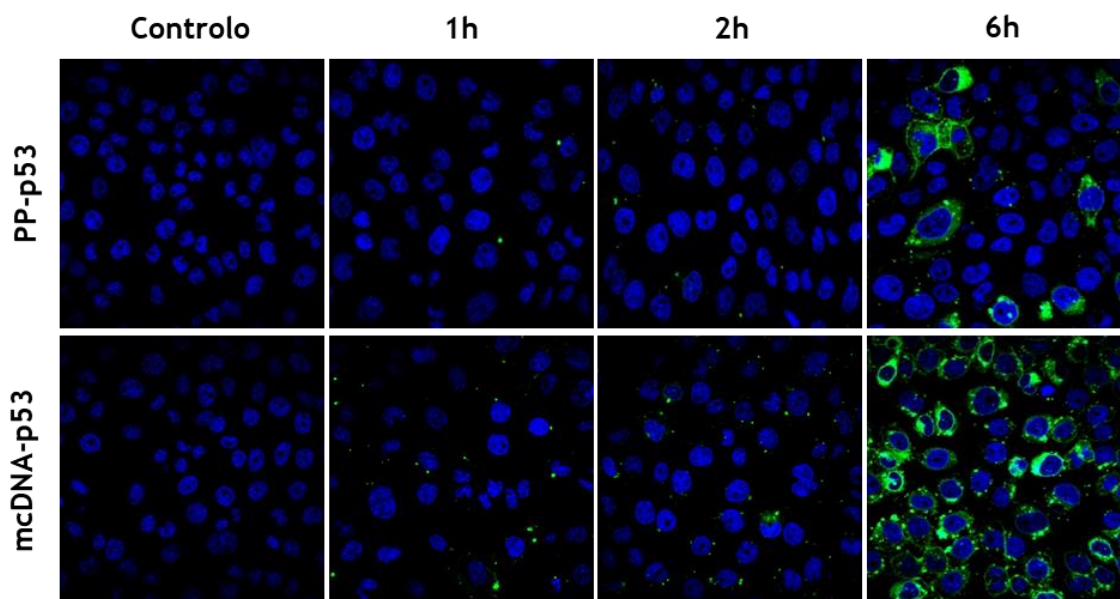


Figura 27: Imagens de microscopia confocal de células HeLa não-transfectadas (controlo) e transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 durante 1, 2 e 6 horas. O núcleo das células está representado a azul e o DNA plasmídico marcado com FITC está representado a verde.

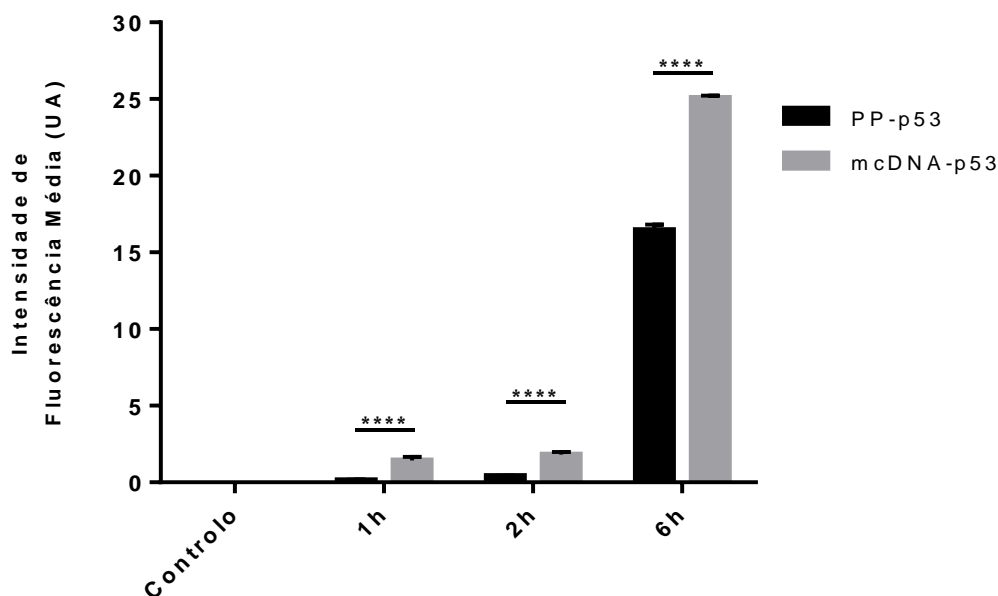


Figura 28: Intensidade de fluorescência média do FITC, a partir de imagens de microscopia confocal (n=3) de células HeLa não-transfectadas e transfectadas durante 1, 2 e 6 horas com os dois vetores marcados. A análise estatística dos resultados foi realizada com o teste *two-way ANOVA*. Encontram-se representadas as significâncias estatísticas (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

Através das imagens de fluorescência (Figura 27), verifica-se uma vez mais que ambos os vetores marcados com FITC (verde) foram capazes de atravessar a membrana celular e entrar no núcleo (azul), sendo possível inferir que as células HeLa foram transfectadas com sucesso. Através da Figura 28 verifica-se o aumento da intensidade de fluorescência média do FITC ao

longo do tempo. Isto indica que, tal como esperado, existe um aumento do número de células transfectadas com sucesso ao longo do tempo. Também é possível verificar que o mcDNA-p53 apresenta uma maior intensidade de fluorescência média em comparação com o PP-p53, em todas as horas avaliadas. Mais uma vez, estes resultados corroboram com o estudo anterior de que o mcDNA-p53 é o vetor que apresenta maior eficiência de transfecção.

#### 4.2.3. Deteção de transcritos do gene p53 - RT-PCR

A técnica de RT-PCR foi realizada com o objetivo de analisar os níveis de transcritos do gene p53, confirmando o sucesso da transcrição do gene de interesse transportado pelos vetores e, conseqüentemente, da eficiência de transfecção avaliada anteriormente. Após 24 horas de transfecção, as células HeLa não-transfectadas e transfectadas com PP-p53 e mcDNA-p53 foram submetidas à extração de RNA. Posteriormente, foi realizada a síntese de cDNA para a realização da técnica de RT-PCR. Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 29).

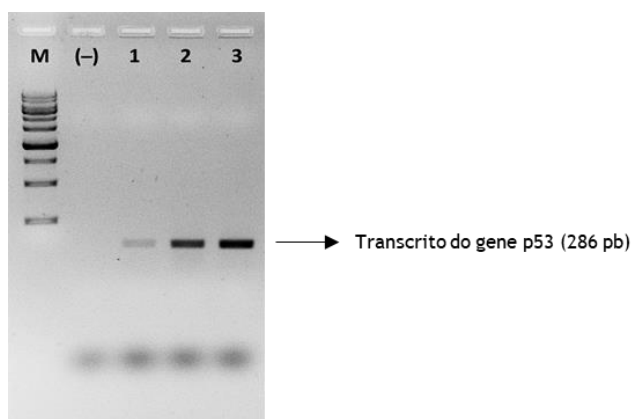


Figura 29: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR para a detecção de transcritos do gene p53 em células HeLa, após 24 horas de transfecção. M - Marcador de peso molecular; (-) - Controle Negativo; 1 - Células não-transfectadas; 2 - Células transfectadas com PP-p53; 3 - Células transfectadas com mcDNA-p53.

Através da Figura 29 verifica-se que foram detetados transcritos do gene p53, após 24 horas de transfecção. As bandas presentes na eletroforese correspondem à amplificação de um fragmento de DNA com o tamanho molecular correto, 286 pb. Também se verificou que existe detecção de transcritos de p53 nas células não-transfectadas. Contudo, como estas células derivam de uma infecção por HPV de elevado risco, é esperado que a proteína p53 traduzida naturalmente seja marcada para degradação pela oncoproteína E6 e se encontre em níveis baixos ou praticamente inexistentes [84]. No entanto, os níveis de transcritos das células não-transfectadas parecem muito inferiores quando comparados com as células transfectadas. Podemos também inferir que os níveis de transcritos de p53 parecem superiores nas células transfectadas com mcDNA-p53, quando comparadas com as células transfectadas com PP-p53.

Estes dados confirmam o sucesso da transcrição do gene de interesse transportado pelos vetores utilizados, e o maior nível de transcritos pode estar relacionado também com eficiência de transfecção ter sido superior com o vetor de mcDNA-p53.

#### 4.2.4. Detecção da proteína p53 - Western Blot

Após transfecção transiente, é importante avaliar não só a eficiência de internalização celular do vetor e chegada ao núcleo, mas também a transcrição do gene transportado pelo vetor de DNA no respetivo transcrito, e conseqüente tradução do transcrito na proteína alvo. Por vezes pode ocorrer algum problema no processo de tradução e um elevado número de transcritos pode não representar um elevado número de proteínas. Por outro lado, o aumento da expressão de uma determinada proteína permite confirmar indiretamente o sucesso da transfecção do vetor e transcrição do gene específico. Deste modo, a técnica de Western Blot foi realizada com o objetivo de detetar e comparar a expressão da proteína p53, no sentido de avaliar a eficiência de transfecção e verificar se os transcritos detetados anteriormente estariam a ser corretamente traduzidos. Como os transcritos de p53 tinham sido detetados após 24 horas de transfecção, avaliou-se a expressão da respetiva proteína em horas posteriores. Assim, após 36 e 48 horas de transfecção, as células HeLa não-transfectadas e transfectadas foram submetidas à extração de proteína, para posteriormente se realizar a técnica de Western Blot (Figura 30).



Figura 30: Western Blot para deteção da proteína p53 e normalização com a proteína *housekeeping* B-actina. Após 36 e 48 horas de transfecção: 1,4 - Células não-transfectadas; 2,5 - Células transfectadas com PP-p53; 3,6 - Células transfectadas com mcDNA-p53.

Através da Figura 30 podemos analisar que praticamente não existe expressão da proteína p53 em células não-transfectadas (linhas 1 e 4), confirmando a ideia referida anteriormente de que embora existam transcritos do gene p53, o nível da proteína é praticamente inexistente, uma vez que a proteína expressa em células infetadas por HPV de elevado risco é marcada para degradação [84]. Por outro lado, tanto após 36 horas como após 48 horas de transfecção, verifica-se que a expressão da proteína p53 é maior em células transfectadas com mcDNA-p53 (linhas 3 e 6) quando comparada com células transfectadas com PP-p53 (linhas 2 e 5), o que está de acordo com os resultados obtidos para a eficiência de transfecção e deteção do transcrito.

Após confirmar a expressão da proteína p53 nas células transfectadas, realizou-se a normalização dos resultados com uma proteína housekeeping, nomeadamente a  $\beta$ -actina. Como esta proteína está envolvida em funções de manutenção celular, encontra-se presente em todas as células humanas e em níveis relativamente constantes [85, 86]. Verificou-se que a expressão da  $\beta$ -actina é relativamente igual em todas as células, pelo que podemos confirmar e validar as diferenças entre a expressão da proteína p53 entre as células não-transfectadas e transfectadas.

Resultados semelhantes foram anteriormente demonstrados. Por exemplo, foi promovido o aumento da expressão da proteína p53 em células HeLa através da transfecção mediada pelo vetor pcDNA3-FLAG-p53 encapsulado em nanopartículas fluorescentes [87], assim como através da transfecção mediada pelo vetor p53-GFP-C3 transportado por um lipossoma catiónico baseado em colesterol [88].

#### 4.2.5. Quantificação da proteína p53 - ensaio ELISA

Uma vez que foi possível detetar a expressão da proteína p53 através da técnica de Western Blot, foi realizado o ensaio ELISA com o intuito de quantificar esta mesma proteína e confirmar as diferenças observadas na intensidade de bandas da proteína expressa pelos dois vetores. Para tal, foram utilizadas amostras de proteína extraída de células HeLa não-transfectadas e transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, após 36 horas de transfecção (Tabela 11 e Figura 31).

Tabela 11: Concentrações de proteína p53 (U/mL) em células HeLa não-transfectadas e transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, após 36 horas de transfecção, obtidas através do ensaio ELISA. Os valores representados foram obtidos a partir de um  $n = 4$  (média  $\pm$  desvio-padrão).

	Concentração de proteína p53 (U/mL)
Células não-transfectadas (controlo)	1,83 $\pm$ 0,85
Células transfectadas com PP-p53	74,75 $\pm$ 4,44
Células transfectadas com mcDNA-p53	91,65 $\pm$ 2,82

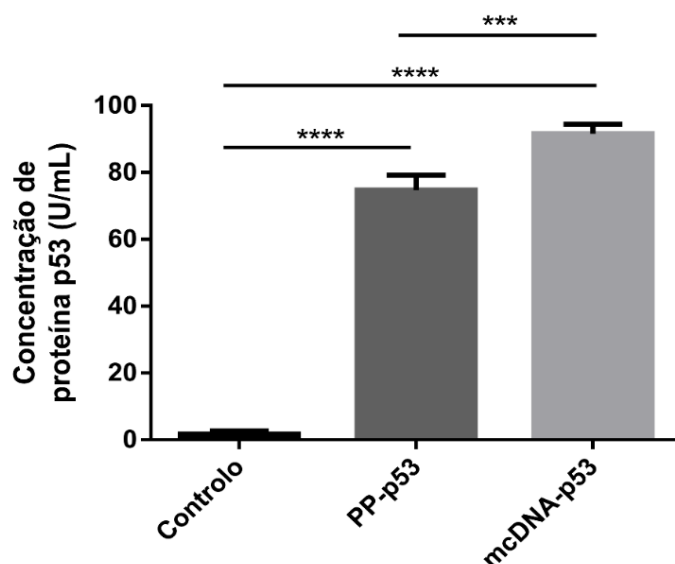


Figura 31: Concentrações de proteína p53 (U/mL) em células controlo e células transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, após 36 horas de transfecção. Os ensaios foram realizados com um  $n = 4$  e a análise estatística foi realizada com o teste *one-way* ANOVA. Encontram-se representadas as significâncias estatísticas (\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

Através da análise da Tabela 11 podemos verificar que os níveis de proteína p53 encontrados em células transfectadas são bastante superiores quando comparados com as células controlo ( $1,83 \pm 0,85$  U/mL). Também é importante salientar que a concentração encontrada para células transfectadas com mcDNA-p53 ( $91,65 \pm 2,82$  U/mL) é significativamente superior à concentração encontrada para células transfectadas com PP-p53 ( $74,75 \pm 4,44$  U/mL).

Os resultados apresentados na Figura 31 comprovam as tendências observadas anteriormente nos resultados de Western Blot, uma vez que o nível de proteína expressa com o vetor de mcDNA-p53 é significativamente superior ao obtido com o vetor de PP-p53. Além disso, também concorda com o facto de que o vetor que permite maior eficiência de transfecção, também vai dar origem a um maior número de transcritos e da respetiva proteína alvo.

#### 4.2.6. Ensaio de proliferação celular

Através dos resultados obtidos anteriormente foi possível verificar que a transfecção com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 induz o aumento dos níveis de proteína p53 em células cancerígenas derivadas de infeção por HPV de elevado risco. Sabe-se que esta proteína supressora de tumor possui a capacidade de induzir a paragem do ciclo celular e/ou a morte celular programada (apoptose), prevenindo o desenvolvimento de tumores [89]. Deste modo, foi realizado um ensaio de proliferação celular com o intuito de avaliar o efeito terapêutico induzido pela transfecção de células cancerígenas HeLa com ambos os vetores que codificam para a proteína p53, tendo-se realizado a contagem do número de células viáveis ao longo de 24, 36, 48 e 72 horas de transfecção com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 (Figura 32).

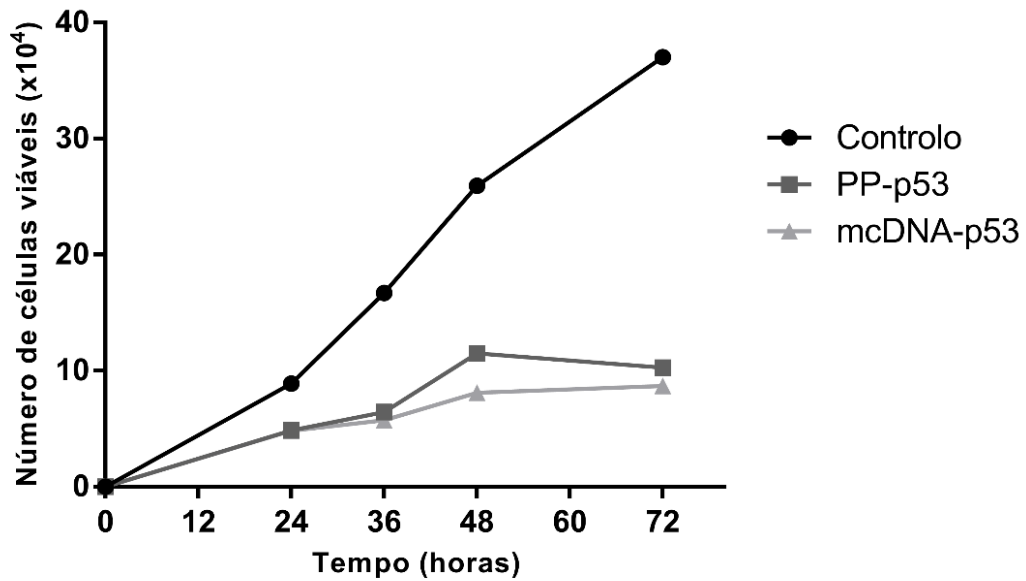


Figura 32: Ensaio de proliferação com células HeLa transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 durante 24, 36, 48 e 72 horas, em comparação com células não-transfectadas (controlo). Os ensaios foram realizados com um  $n = 3$  e a análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA. Os resultados apresentam uma significância estatística de  $P < 0,0001$  (\*\*\*\*) em relação ao controlo.

Na Figura 32 encontra-se a representação gráfica do número de células viáveis ao longo do tempo. Após 24 e 36 horas de transfecção, é possível verificar que praticamente não existem diferenças no número de células viáveis entre os dois vetores. Por outro lado, após 48 horas de transfecção verifica-se uma ligeira diferença entre os dois vetores, com o mcDNA-p53 a inibir a proliferação mais acentuadamente que o PP-p53. Deste modo, o vetor de mcDNA-p53 apresenta uma maior eficiência em suprimir a proliferação celular, o que está de acordo com os resultados descritos anteriormente, uma vez que este vetor também apresentava maiores níveis de proteína p53, após 48 horas de transfecção. Apesar das diferenças entre os vetores não serem muito significativas, ambos conseguem inibir significativamente a proliferação celular ao longo do tempo, o que é possível verificar comparando com o número de células viáveis das células controlo.

Este efeito inibitório é semelhante ao demonstrado noutra estudo, em que também foi realizada a contagem do número de células HeLa ao longo do tempo (8 dias), após transfecção com um vetor de DNA plasmídico que codifica para o gene p53 (pcDNA3-FLAG-p53) [87].

#### 4.2.7. Avaliação da citotoxicidade celular - Ensaio com resazurina

A citotoxicidade dos vetores PP-p53 e mcDNA-p53 foi avaliada através do ensaio com resazurina. Deste modo, células HeLa foram utilizadas como modelo de células cancerígenas e Fibroblastos foram utilizados com modelo de células não cancerígenas. As transfecções com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 foram realizadas durante 24, 36, 48 e 72 horas. Os resultados da viabilidade celular apresentados na Figura 33 foram calculados em relação ao controlo negativo (células não-transfectadas) estabelecido para 100%.

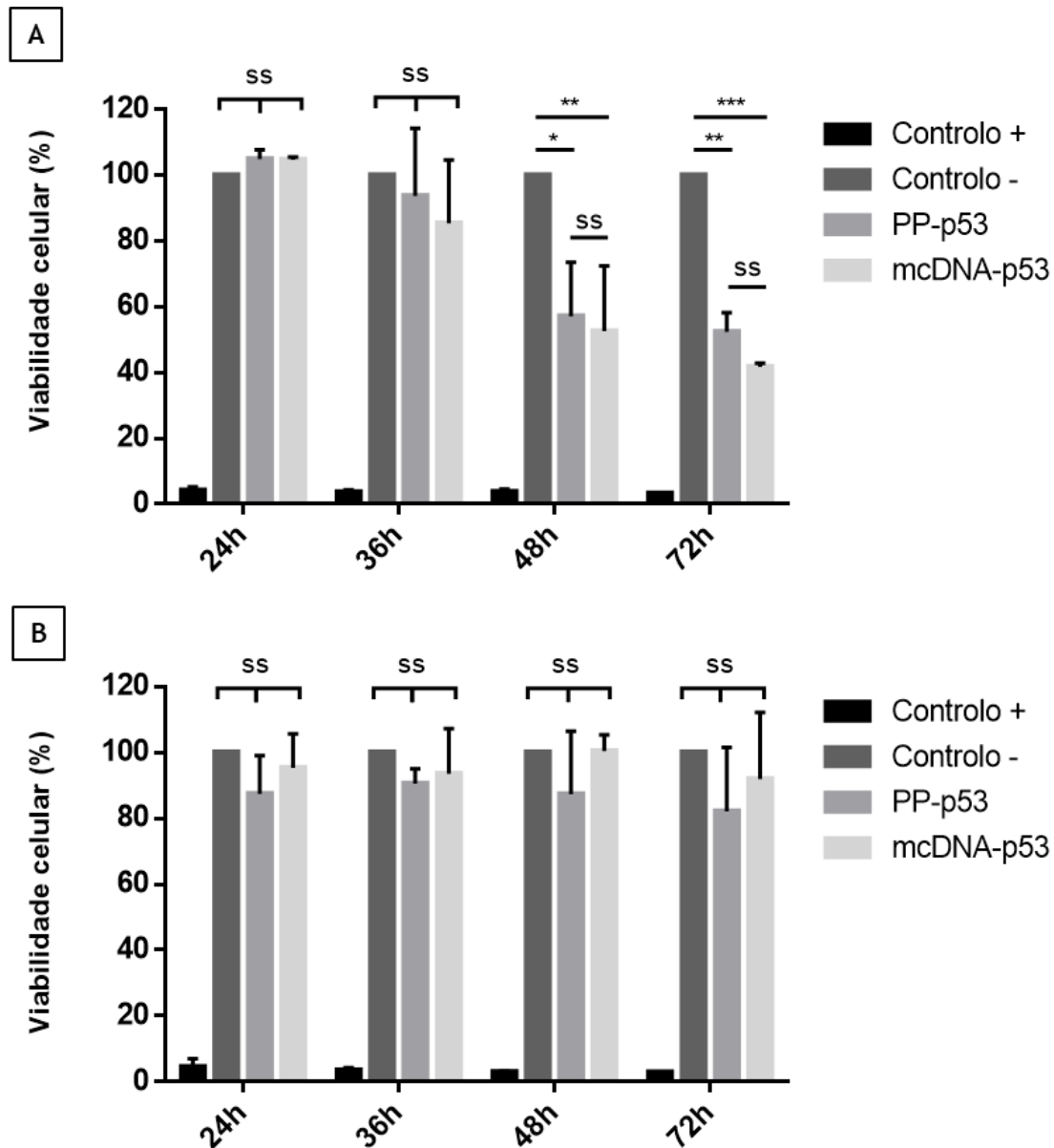


Figura 33: Percentagens de viabilidade celular em relação ao controlo negativo (células não-transfectadas) em células HeLa (A) e em Fibroblastos (B), após transfecções com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53 durante 24, 36, 48 e 72 horas. Os ensaios foram realizados com um  $n = 4$  e a análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA. Encontram-se representadas as significâncias estatísticas (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; SS - sem significância).

Através dos resultados representados na Figura 33 é possível verificar que existe uma diminuição da viabilidade de células HeLa (cancerígenas) ao longo do tempo, após transfecção com ambos os vetores. No entanto, após 48 e 72 horas de transfecção é quando começa a haver uma diferença significativa entre estes vetores e o controlo negativo. Após 48 horas, o PP-p53 e o mcDA-p53 apresentam uma diminuição da viabilidade celular em cerca de 57% e 52%, respetivamente, sendo que após 72 horas os valores diminuem para 53% e 42%, respetivamente. Estes resultados estão de acordo com o estudo de proliferação celular. Mais uma vez, o mcDNA-p53 apresenta um efeito mais acentuado em comparação com o PP-p53.

Os resultados da viabilidade celular obtidos com Fibroblastos são particularmente importantes, uma vez que indicam que os vetores utilizados não causam efeitos citotóxicos, pois os valores de viabilidade celular não sofrem alterações significantes ao longo de todas as horas avaliadas, sendo todos superiores a 82%. A diferença observada entre os dois vetores pode estar relacionada com o processo de purificação aplicado em cada situação, sugerindo que o vetor de mcDNA-p53 apresenta menor conteúdo de impurezas que se reflete numa maior viabilidade celular. Além disso, comparando os resultados obtidos nos dois tipos de células, é possível constatar que a citotoxicidade observada em células cancerígenas se deve maioritariamente ao efeito terapêutico do gene p53 presente nos vetores, nomeadamente com indução da apoptose, e não devido à toxicidade induzida pelos vetores propriamente ditos [90, 91].

#### **4.2.8. Avaliação da indução de apoptose - Kit de apoptose**

A avaliação da indução de apoptose foi realizada através do kit HT TiterTACS™, com o intuito de analisar se os níveis aumentados de proteína p53, avaliados anteriormente, induziriam a morte celular programada. Os resultados foram analisados através da leitura da absorvância a 450 nm, com células tratadas com uma solução-padrão de endonucleases fornecida pelo kit (controlo +), células não-transfectadas (controlo -) e células transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, após 48 horas de transfecção, como representado na Figura 34.

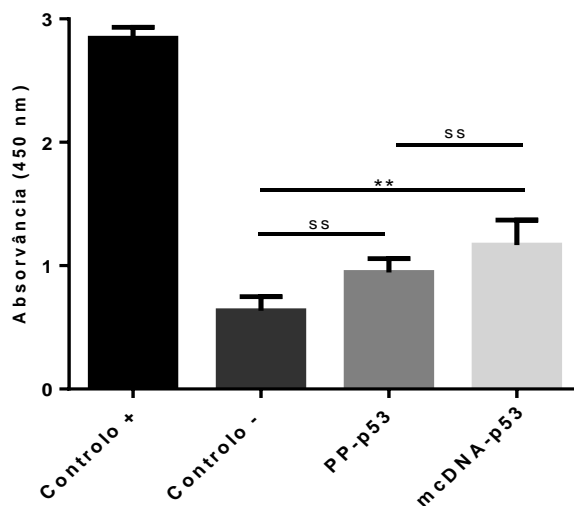


Figura 34: Avaliação da indução da apoptose, após 48 horas de transfecção com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53. Os ensaios foram realizados com um  $n = 4$  e a análise estatística foi realizada com o teste *one-way* ANOVA. Encontram-se representadas as significâncias estatísticas (\*\*  $P < 0,01$ ; SS - sem significância).

Na Figura 34 encontra-se representada a absorvância a 450 nm para cada um dos grupos avaliados. Em primeiro lugar, é importante referir que o processo de apoptose foi avaliado através da deteção da fragmentação do DNA celular, que ocorre devido à ativação de endonucleases. O kit utilizado permitiu a deteção de células apoptóticas através da marcação de fragmentos de DNA. Esta marcação foi realizada pela enzima TdT que promove a incorporação de nucleótidos modificados nas extremidades 3' dos fragmentos de DNA, sendo que estes nucleótidos foram detetados através de um sistema de HRP-estreptavidina e um substrato específico. Deste modo, o aumento da absorvância traduz-se no aumento da fragmentação celular, e conseqüentemente, no aumento da indução da apoptose.

Neste ensaio, o controlo positivo foi tratado com uma solução-padrão de endonucleases fornecido pelo kit, de modo a provocar fragmentações de DNA em todas as células. Este controlo permite confirmar que a reação colorimétrica foi bem-sucedida. As leituras de absorvância do controlo positivo também fornecem um valor máximo, pelo que é esperado que todos os valores experimentais obtidos tenham valores de absorvância inferiores. Por outro lado, o controlo negativo consistiu em células não-transfectadas, sendo expectável obter valores baixos de absorvância.

Através deste ensaio foi possível verificar que ambos os vetores induzem a apoptose celular, após 48 horas de transfecção, uma vez que existe um aumento da absorvância relativamente ao controlo negativo. No entanto, é de realçar que as células transfectadas com mcDNA-p53 apresentam um aumento significativo da apoptose em relação às células não-transfectadas, enquanto que com o PP-p53 o aumento não é tão significativo. Estes resultados confirmam que a transfecção com o mcDNA-p53 apresenta resultados mais promissores em comparação com o PP-p53.

Após 48 horas de transfecção já se tinha verificado um aumento considerável dos níveis de proteína p53 com ambos os vetores por Western Blot, assim como uma diminuição da viabilidade celular, o que está de acordo e explica esta indução da apoptose das células cancerígenas.

Resultados semelhantes foram observados anteriormente. Um estudo demonstrou pelo método MTT que células HeLa transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-FLAG-p53 encapsulado em microgéis apresentam uma diminuição da viabilidade celular [90]. Outro estudo também confirmou que os níveis aumentados de proteína p53 induzem a morte celular programada em células HeLa, transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-FLAG-p53, utilizando um kit de apoptose baseado em Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio (PI) [91].

### 4.3. Construção do DNA minicircular multigénico

Numa segunda vertente deste trabalho de mestrado, foi realizada a construção de um vetor de mcDNA multigénico, com clonagem de dois genes terapêuticos no PP. Uma vez que já temos disponível o PP com o gene p53 clonado a seguir ao promotor MCV7, foi realizada clonagem para substituir o gene GFP pelo gene pri-miRNA-375 a seguir ao promotor EF1 (Figura 35), com o intuito restabelecer os níveis do supressor de tumor p53 e inibir a expressão das oncoproteínas E6 e E7 em células cancerígenas do colo do útero, respetivamente.

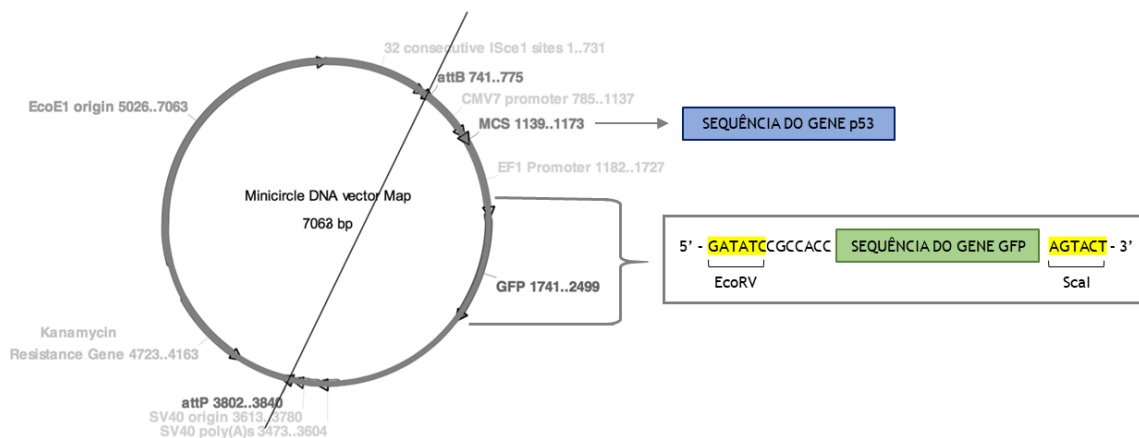


Figura 35: Representação esquemática do vetor PP-p53 mutado e mapa de restrição das enzimas.

A construção deste vetor visa uma potencial aplicação terapêutica mais rápida e eficaz no cancro do colo do útero, uma vez que este vetor multigénico permite dois mecanismos de ação anticancerígena que se complementam.

### 4.3.1. Plasmídeos e enzimas de restrição utilizados

Para a clonagem de um novo vetor de mcDNA multigênico, primeiramente foi importante selecionar enzimas de restrição que reconhecessem apenas um local de restrição em toda a sequência do vetor de partida e no local correto (à frente do promotor EF1). Com este intuito, o vetor PP-p53 utilizado ao longo das estratégias de purificação e estudos de transfecção *in vitro* descritos anteriormente foi sujeito a mutagênese, de modo a que cumprisse estes critérios. Assim, foram incluídos os locais de restrição para as enzimas EcoRV e Scal (enzimas pouco comuns, mas que não reconhecem qualquer outra sequência de DNA em todo o vetor).

O vetor PP-p53 foi corretamente mutado pela empresa NZYTech, no sentido de criar os locais de reconhecimento para a enzima EcoRV imediatamente a seguir à sequência do promotor EF1 e para a enzima Scal no final da sequência da proteína GFP (ver relatório de sequenciação em anexo III). Desta forma, ao realizar digestão completa com as duas enzimas de restrição indicadas, é esperada a clivagem do gene GFP (originalmente presente no vetor de PP-p53), sendo possível clonar neste local o novo gene terapêutico de interesse (gene pri-miRNA-375). É também importante salientar que estas duas enzimas de restrição possuem a particularidade de originarem fragmentos de DNA com extremidades cegas, como representado na Figura 36.



Figura 36: Sequências de reconhecimento das enzimas de restrição EcoRV e Scal.

Com o objetivo de realizar a clonagem e permitir a ligação do fragmento de interesse ao vetor de expressão, torna-se necessário utilizar as mesmas enzimas de restrição para clivar tanto o vetor de PP-p53 mutado como o fragmento pri-miRNA-375, no sentido de obter extremidades compatíveis.

### 4.3.2. Amplificações e digestões do vetor e fragmento

Para iniciar a construção do vetor multigênico, foi realizada a amplificação do PP-p53 mutado, através da fermentação bacteriana em *E. coli* ZYCY10P3S2T num orbital a 42°C e com agitação de 250 rpm, até atingir uma  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 5. Para obter o fragmento de pri-miRNA-375, foi também realizada a amplificação do vetor PP-pri-miRNA-375 (que contém o gene pri-miRNA-375 à frente do promotor CMV7), exatamente com as mesmas condições. Posteriormente, foi realizada a purificação destes dois vetores.

Em primeiro lugar, de modo a confirmar se as enzimas EcoRV e Scal reconheceriam corretamente os locais de restrição presentes no vetor PP-p53 mutado, foram realizadas digestões sequenciais, uma vez que o tampão das enzimas era o mesmo (10X H Buffer). Cada reação enzimática foi incubada durante 1 hora a 37°C, e os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,6% (Figura 37).

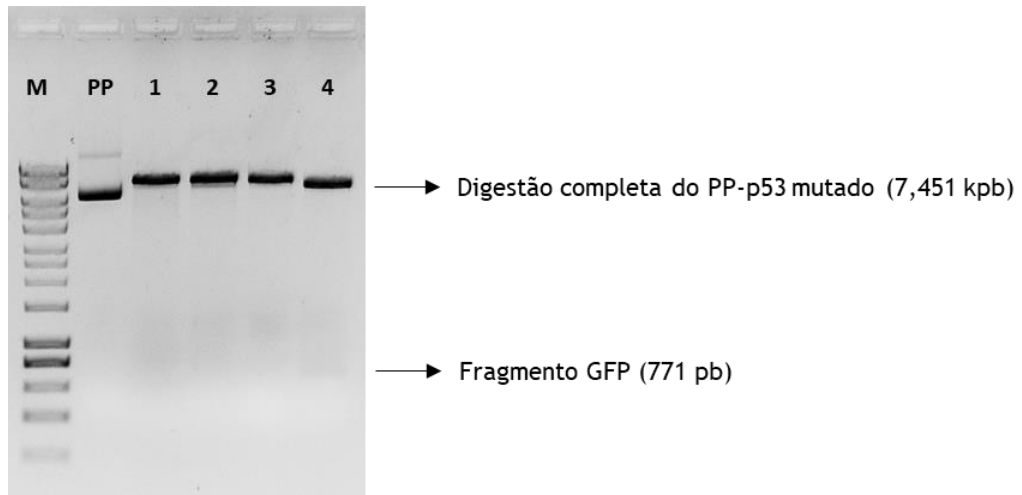


Figura 37: Eletroforese em gel de agarose 0,6% das digestões sequenciais. M - Marcador de peso molecular; PP - PP-p53 mutado (purificado e não digerido); 1 - Digestão com EcoRV; 2 - Digestão sequencial com EcoRV + Scal; 3 - Digestão com Scal; 4 - Digestão sequencial com Scal + EcoRV.

Através da Figura 37 parece que ocorreu linearização do vetor PP-p53 mutado quando este é digerido com a enzima EcoRV (linha 1) ou com a enzima Scal (linha 3). No entanto, quando a digestão sequencial é realizada primeiramente com a enzima EcoRV e só depois com a enzima Scal (linha 2), verifica-se que não existe uma diferença significativa de tamanho. Por outro lado, quando a primeira digestão é realizada com a enzima Scal e só depois com a enzima EcoRV (linha 4), parece haver presença do fragmento de GFP, embora não seja muito evidente. Estes resultados sugerem que a enzima Scal não realiza corretamente a sua digestão ou que tem alguma dificuldade em reconhecer o seu local de restrição quando o vetor já se encontra linearizado, pelo que as suas condições de atuação foram otimizadas, de acordo com algumas sugestões fornecidas no protocolo do fabricante.

Assim, o protocolo sugeria adicionar BSA para uma concentração final de 0,01% nas misturas reacionais, aumentando a atividade relativa da enzima até 120% a 30 °C e até 240% a 25 °C, não apresentando influência a 37 °C. A partir destas sugestões, foram realizados vários *screenings* das melhores condições para a enzima Scal atuar (Figura 38). Em primeiro lugar, aumentou-se o tempo reacional a 37 °C para 2 horas, não usando BSA porque não influencia a atividade da enzima a esta temperatura (linhas 1 e 2). Em todas as restantes reações foi utilizada BSA, porque foram realizadas a temperaturas de 30 °C e 25 °C. Assim, também foram testadas reações durante 2 horas a 30 °C (linhas 3 e 4) e a 25 °C (linhas 5, 6, 7 e 8). Em condições

de digestão a 25 °C, também foram testados volumes reacionais de 10 µL (linhas 5 e 6) e de 20 µL (linhas 7 e 8). Como 25 °C era a temperatura sugerida para aumentar mais acentuadamente a atividade relativa da enzima, também foram testadas digestões *overnight* com esta mesma temperatura (linhas 9 e 10). Todas as condições foram testadas com PP-p53 mutado (purificado) até 250 ng (linhas ímpares) e até 500 ng (linhas pares), como representado na Figura 38.

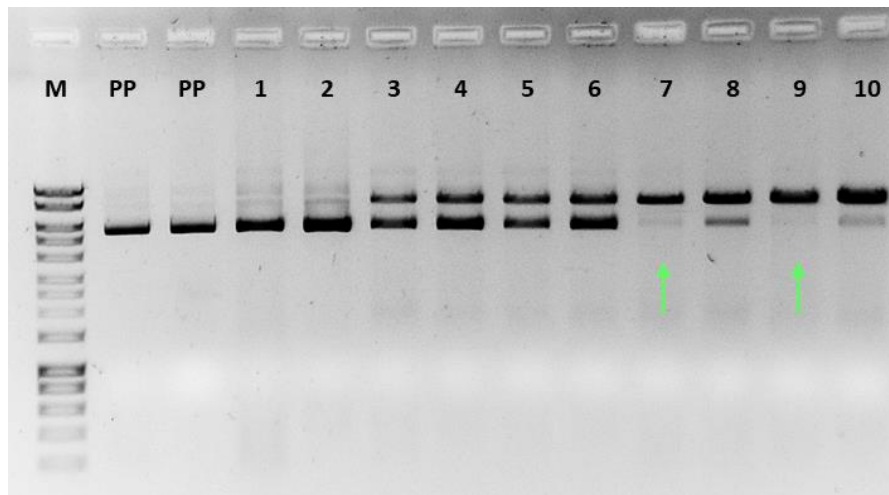


Figura 38: Eletroforese em gel de agarose 0,6% das várias condições testadas para a enzima Scal. M - Marcador de peso molecular; PP - PP-p53 mutado (purificado e não digerido); Linhas 1, 2 - Digestões durante 2 horas a 37 °C; Linhas 3, 4 - Digestões durante 2 horas a 30 °C com BSA; Linhas 5, 6, 7, 8 - Digestões durante 2 horas a 25 °C com BSA; Linhas 9, 10 - Digestões *overnight* a 25 °C com BSA. Todas as condições foram testadas até 250 ng (linhas ímpares) e até 500 ng (linhas pares). As setas a verde representam as melhores condições encontradas.

Através da Figura 38 verifica-se que praticamente não existe linearização do vetor em condições de 37 °C (linhas 1 e 2). Em condições de 30 °C existe uma maior percentagem de linearização do vetor, no entanto não é satisfatória (linhas 3 e 4). Por outro lado, verifica-se uma melhoria acentuada da atuação da enzima quando a temperatura reacional é de 25 °C (linhas 5, 6, 7, 8, 9, e 10). Utilizando as mesmas condições, também é possível verificar que utilizando um volume reacional de 20 µL (linhas 7 e 8) em vez de 10 µL (linhas 5 e 6) favorece a linearização do vetor. Realizar a digestão *overnight* (linhas 9 e 10) não melhorou significativamente a linearização do vetor quando comparada com a digestão realizada durante 2 horas (linhas 7 e 8). Também é possível inferir que utilizando DNA até 250 ng aumenta a eficiência da enzima (linhas 7 e 9) quando comparado com a utilização de DNA até 500 ng (linhas 8 e 10).

Depois de uma análise cuidadosa de todas estas condições, conclui-se que 25° C seria a temperatura ótima de atuação da enzima Scal, durante 2 horas, utilizando BSA para uma concentração final de 0,01%, adicionando DNA até 250 ng e usando um volume reacional de 20 µL (linha 7). Após selecionar estas condições, foi realizada uma nova digestão enzimática e os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,6% (Figura 39).



Figura 39: Eletroforese em gel de agarose 0,6% da primeira digestão enzimática. M - Marcador de peso molecular; 1 - PP-p53 mutado (purificado e não digerido); 2 - Digestão com a enzima Scal.

Através da Figura 39, podemos verificar que ocorreu a linearização do PP-p53 mutado através da digestão com a enzima Scal nas condições selecionadas (2), uma vez que existe uma diferença significativa na migração do vetor não digerido (1). O facto de o vetor ficar linearizado faz com que exista um retardamento na sua migração no gel de agarose em comparação com o vetor circular. Após a análise destes resultados, os produtos da primeira digestão foram purificados com um kit de purificação de produtos PCR, sendo posteriormente utilizados na segunda digestão enzimática com EcoRV, durante 2 horas a 37°C. Os resultados foram novamente analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,6% (Figura 40).

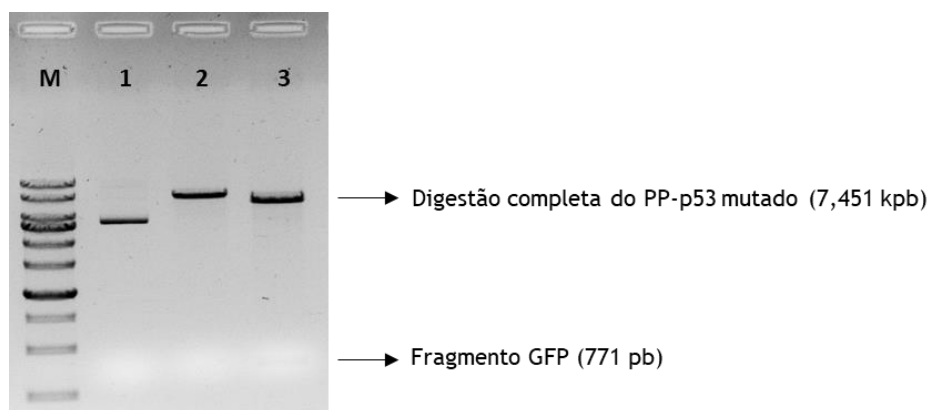


Figura 40: Eletroforese em gel de agarose 0,6% da primeira e segunda digestão enzimática. M - Marcador de peso molecular; 1 - PP-p53 mutado (purificado e não digerido); 2 - Primeira digestão com a enzima Scal; 3 - Segunda digestão com a enzima EcoRV.

Os resultados apresentados na Figura 40 parecem demonstrar que ocorreu a segunda digestão do vetor de PP-p53 mutado pela enzima EcoRV, observando-se uma ligeira diminuição do tamanho do vetor (3) em comparação quando só digerido com a enzima Scal (2). A banda que deverá corresponder ao fragmento GFP que sofreu clivagem a partir do PP-p53 mutado (com um tamanho de 771 pb) não é muito evidente, contudo prosseguiu-se com o processo de clonagem.

A partir destes resultados, a purificação dos produtos de digestão foi realizada através do gel de agarose, de forma a eliminar o fragmento de GFP e impedir a sua religação no processo de ligação em vez do fragmento de interesse. Para isto, foi necessário cortar o gel de agarose na zona com o vetor de DNA linear (digestão completa do PP-p53 mutado) e solubilizá-lo, de acordo com as instruções do kit de purificação.

O passo seguinte consistiu na desfosforilação do vetor de PP-p53 mutado (completamente digerido e purificado), através da utilização da enzima fosfatase alcalina, uma vez que este processo poderia ajudar a prevenir a religação do vetor durante a etapa de clonagem. Após desfosforilação a 37 °C durante 1 hora, a mistura reacional foi novamente purificada.

Após produção e purificação do vetor de PP-pri-miRNA-375, foi realizada a técnica de PCR com o objetivo de amplificar o fragmento pri-miRNA-375. Foram utilizados *primers* específicos para a amplificação deste fragmento, que incluem nas extremidades as sequências de reconhecimento para as enzimas de restrição EcoRV e Scal. Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 41).

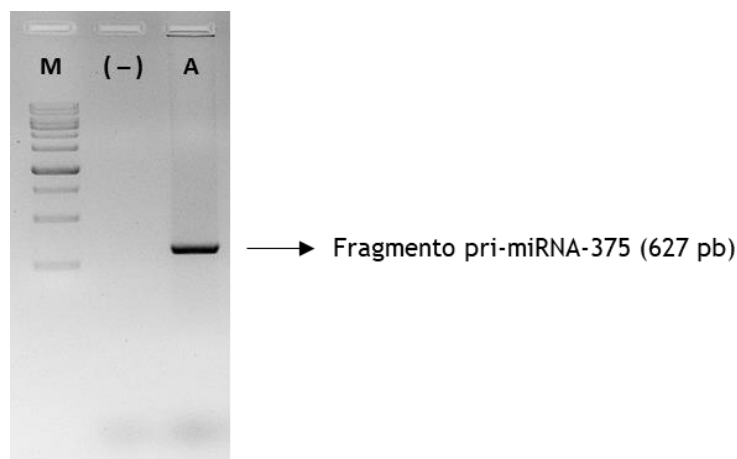


Figura 41: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para amplificação do fragmento pri-miRNA-375 . M - Marcador de peso molecular; (-) - Controlo negativo; A - Fragmento pri-miRNA-375 amplificado.

Como representado na Figura 41, podemos observar uma única banda que corresponde ao tamanho correto do fragmento pri-miRNA-375, nomeadamente 627 pb. Através deste resultado podemos confirmar o sucesso de amplificação por PCR, sendo que posteriormente foi realizada a purificação deste fragmento com o kit de purificação de produtos PCR, digestão com as respetivas enzimas de restrição e nova purificação.

### 4.3.3. Clonagem e transformação de células *E. coli* competentes

Após todas as etapas descritas anteriormente, estão reunidas as condições necessárias para realizar a clonagem do novo vetor multigénico, que consiste na ligação do vetor de PP-p53 mutado (digerido e desfosforilado) e do fragmento de pri-miRNA-375 (digerido). Uma vez que as digestões do vetor e do fragmento foram realizadas com a utilização das mesmas enzimas de restrição e das mesmas condições, estes adquirem exatamente as mesmas extremidades cegas, tornando possível a etapa de clonagem.

Várias condições foram testadas para a etapa de clonagem, tais como diferentes rácios fragmento : vetor (1:1, 1:3, 3:1, 5:1, 9:1 e 10:1), diferentes quantidades de enzima T4 DNA Ligase (1 µL, 2 µL e 3 µL) e diferentes temperaturas de incubação (4 °C, 18 °C e 20 °C). Após 18 horas de incubação, células competentes de *E. coli* TOP10 foram transformadas com as misturas reacionais por choque térmico.

É importante mencionar que a transformação bacteriana é um processo no qual as bactérias conseguem capturar DNA exógeno. Uma vez que este fenómeno não ocorre naturalmente em *E. coli*, em primeiro lugar foi necessário tornar estas células competentes para viabilizar a introdução do DNA plasmídico. Neste caso em particular, foram utilizadas células *E. coli* TOP10, uma vez que esta estirpe é adequada para processos de clonagem porque apresenta uma elevada eficiência de transformação [92]. Após transformação, as culturas bacterianas foram inoculadas em placas LB-agar contendo canamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37 °C.

Nas condições testadas em que cresceram colónias bacterianas isoladas, estas foram analisadas através de PCR para confirmar a presença do fragmento pri-miRNA-375 e a ausência do fragmento GFP, ou seja, para confirmar o sucesso da etapa de clonagem. Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 42).

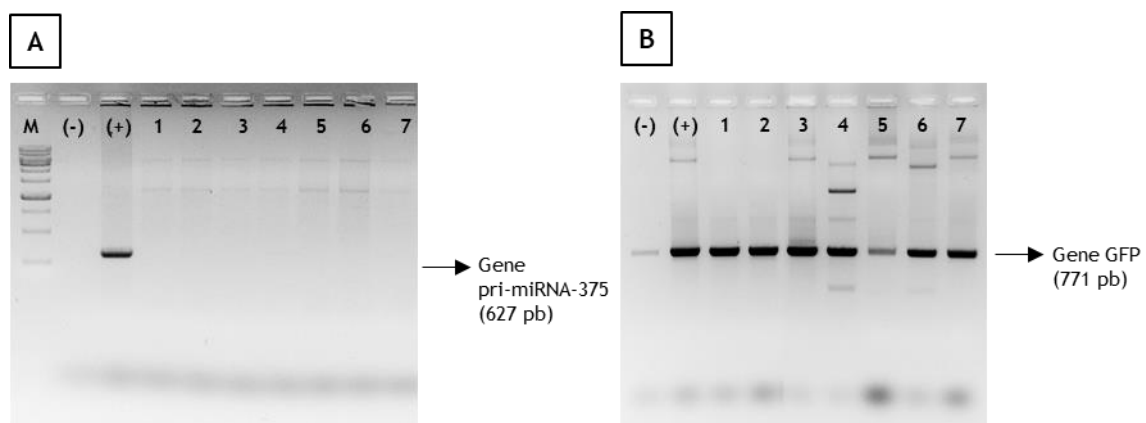


Figura 42: Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR para a amplificação do gene pri-miRNA-375 (A) e do gene GFP (B). M - Marcador de peso molecular; (-) - Controlo negativo; (+) - Controlo positivo; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 - Colónias bacterianas analisadas.

Verifica-se que não foi possível incluir o gene pri-miRNA-375 em nenhuma das colónias bacterianas analisadas (A), indicando que a clonagem não foi realizada com sucesso. Por outro lado, verifica-se a presença do gene GFP em todas as colónias bacterianas analisadas (B). Apesar de uma pequena contaminação no controlo negativo, é possível verificar uma amplificação bastante pronunciada do gene GFP em todas as colónias. Isto indica que o problema estará nas digestões enzimáticas, uma vez que não foi possível remover o fragmento GFP do vetor PP-p53 mutado.

Apesar das várias tentativas que foram feitas, a clonagem do fragmento pri-miRNA-375 no vetor PP-p53 mutado não foi realizada com sucesso. Como consequência, foi requisitada a realização deste passo de clonagem a uma empresa (GeneCust, Luxemburgo), cujo relatório de clonagem se encontra no anexo IV.

Células competentes de *E. coli* TOP10 e ZYCY10P3S2T foram transformadas com este vetor clonado, através de choque térmico. As misturas reacionais foram inoculadas em placas de LB-agar com canacimica (50 µg/mL) e incubadas a 37°C. Após crescimento, algumas colónias isoladas foram confirmadas para a presença do gene p53 e do gene pri-miRNA-375 através da técnica de PCR. Como controlo positivo foi utilizado o vetor clonado e os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 43).

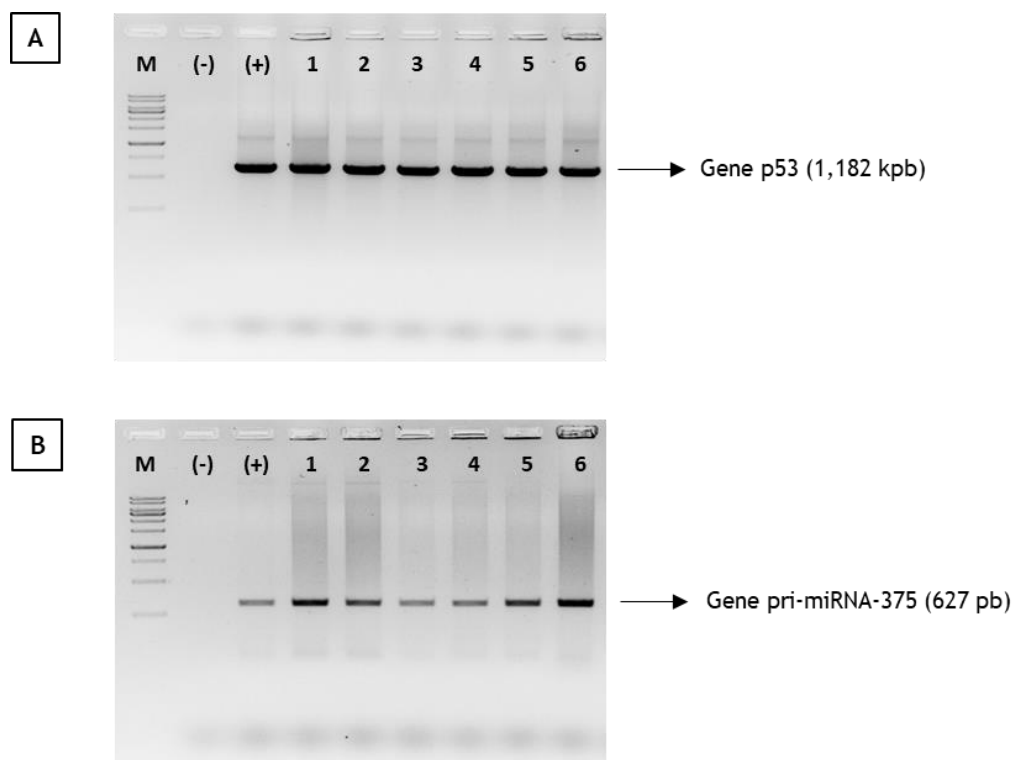


Figura 43: Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR a partir de colónias isoladas: amplificação do gene p53 (A) e amplificação do gene pri-miRNA-375 (B). M - Marcador de peso molecular; (-) Controlo negativo; (+) Controlo positivo; 1, 2, 3 - Colónias transformadas da estirpe *E. coli* TOP10; 4, 5, 6 - Colónias transformadas da estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T.

Através da Figura 43 é possível verificar que todas as colónias analisadas foram transformadas com sucesso, uma vez que possuem os dois genes terapêuticos de interesse. Como tal, foi promovido o crescimento em meio líquido (LB) de uma colónia de cada estirpe (3 e 4). Após incubação *overnight* a 37°C, foi realizada a purificação do DNA plasmídico.

#### 4.3.4. Estudo preliminar de transfecção com o vetor de PP multigénico

Com o objetivo de avaliar a funcionalidade do novo vetor de PP multigénico, foi realizado um estudo preliminar de transfecção *in vitro* durante 24 horas, utilizando a linha celular CaSki. Deste modo, foram avaliados os níveis de transcritos do gene p53 e dos oncogenes E6 e E7, em células não-transfectadas e células transfectadas com o PP multigénico, por RT-PCR. Os resultados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 44).

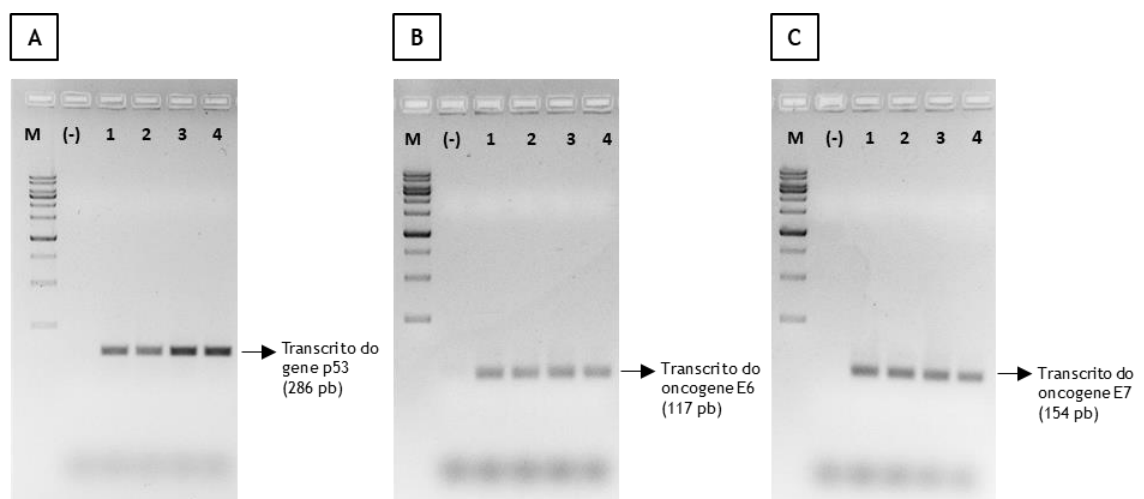


Figura 44: Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de RT-PCR para a detecção de transcritos do gene p53 (A) e dos oncogenes E6 (B) e E7 (C). M - Marcador de peso molecular; (-) - Controlo Negativo; 1, 2 - Células não-transfectadas; 3, 4 - Células transfectadas com PP multigénico.

Através da Figura 44 verifica-se que, após 24 horas de transfecção, existe um aumento dos níveis de transcritos do gene p53 (A) entre células não-transfectadas (1, 2) e células transfectadas com o PP multigénico (3, 4). Por outro lado, está descrito que a expressão do miRNA-375 vai silenciar os transcritos das oncoproteínas E6 e E7 do HPV [22]. No entanto, as diferenças entre os níveis de transcritos dos oncogenes E6 (B) e E7 (C) não são muito evidentes. Este resultado pode indicar que, após 24 horas de transfecção, o miRNA-375 ainda não provocou uma influência significativa sobre os transcritos dos oncogenes. Relembrando que o gene p53 e o gene pri-miRNA-375 estão sobre a influência de promotores diferentes, este resultado pode ser explicado pelo facto de o promotor EF1 não ser tão eficiente na transcrição do gene alvo quanto o promotor CMV7.

Esta suspeita já foi anteriormente levantada nos estudos de transfecção *in vitro* com células HeLa, em que se tentou avaliar a eficiência de transfecção dos vetores PP-p53 e mcDNA-p53 através da monitorização da expressão da proteína GFP (Figura 45).

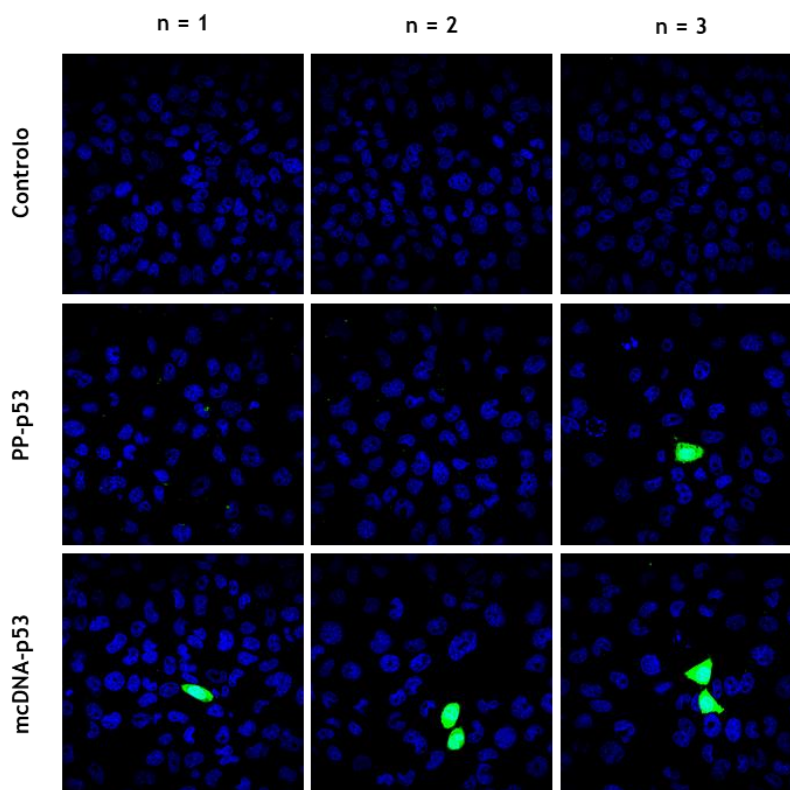


Figura 45: Imagens de microscopia confocal (n = 3) de células HeLa não-transfectadas (controlo) e transfectadas com os vetores PP-p53 e mcDNA-p53, durante 36 horas. O núcleo das células está representado a azul e a expressão da proteína GFP está representada a verde.

O gene GFP é frequentemente utilizado como gene repórter, sendo possível observar as células transfectadas com sucesso, uma vez que a proteína GFP expressa apresenta uma fluorescência verde quando exposta a luz UV [93, 94]. Através das imagens de microscopia confocal representadas na Figura 45, verifica-se que quase não existem células transfectadas, durante 36 horas. Considerando os resultados anteriores de Western Blot, estes demonstraram uma elevada expressão de proteína p53 após 36 horas de transfecção, no entanto, com este mesmo tempo de transfecção, não se verifica uma elevada expressão de GFP. Através de resultados anteriores também foi demonstrado que ambos os vetores tinham a capacidade de efetuar a internalização celular com sucesso (*live cell imaging*) e estes apresentaram uma elevada eficiência de transfecção (*end-points*). Considerando estas evidências, não se coloca em causa que as células tenham internalizado pouca quantidade de vetor, mas sim que o vetor, após 36 horas de transfecção, ainda não conseguiu expressar proteína GFP suficiente. Assim sendo, estes resultados também sugerem que o promotor EF1 (para o gene GFP) não é tão eficiente quanto o promotor CMVT (para o gene p53).

# Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras

Considerando a elevada prevalência de infeções por HPV e um crescente número de casos de cancro do colo do útero, torna-se necessário encontrar tratamentos eficazes para esta doença. As terapias baseadas em DNA têm sido consideradas como uma estratégia inovadora, surgindo o vetor de mcDNA como uma alternativa promissora relativamente ao DNA plasmídico.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo produzir um vetor de mcDNA que codifica para o gene supressor de tumor p53. De modo a ser possível aplicar este vetor em abordagens terapêuticas, tornou-se necessário purificar a isoforma biologicamente ativa (sc).

Os resultados cromatográficos obtidos sugeriram que o ligando de 1-benzil-L-histidina apresenta pouca seletividade para isolar o mcDNA-p53. Por outro lado, através da avaliação dos tempos de retenção de cada biomolécula no monolito de L-histidina, nomeadamente PP-p53, mcDNA-p53 e RNA, foi possível verificar que a utilização de um tampão a pH 5,0 permite tempos de retenção mais distintos das impurezas em relação ao mcDNA, favorecendo assim a seletividade do suporte cromatográfico, do que um tampão a pH 8,0.

Foi também demonstrado que é promovida uma interação mais forte entre as biomoléculas e a coluna quando é realizada uma ligação efetiva a 100%, sendo necessárias condições mais drásticas para enfraquecer as interações que foram estabelecidas. Para além disto, utilizar uma coluna convencional onde a transferência de massa ocorre por difusão (ao contrário do monolito que ocorre por convecção) e com maior volume, não alterou o comportamento de separação entre as biomoléculas. Também foi verificado que a presença de RNA na amostra diminui a força de interação estabelecida entre o mcDNA-p53 e o monolito de L-histidina, sendo facilmente destabilizada por pequenas diminuições da força iónica. Estes resultados indicaram que as interações estabelecidas com a coluna são mais fracas na amostra complexa quando comparadas com as interações estabelecidas utilizando amostras simples.

Concluindo, a melhor estratégia de purificação encontrada por cromatografia de afinidade foi utilizando o monolito modificado com L-histidina, e uma amostra complexa de lisado, realizando um passo de ligação de 100% de 3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM citrato-EDTA (pH 5,0), seguido da diminuição da força iónica para 85%, 78% e 0%, permitindo recuperar grande parte da isoforma sc do mcDNA-p53 no 2º pico cromatográfico.

Por outro lado, a estratégia cromatográfica de filtração em gel permitiu uma separação efetiva entre o RNA e as restantes biomoléculas, para além de promover a remoção do sal das amostras e obtenção de maiores quantidades de mcDNA-p53 por cada ensaio cromatográfico. Através de densitometria de bandas, foi demonstrado que a fração purificada através de filtração em gel apresentava um maior grau de pureza, pelo que estas frações foram utilizadas em todos os estudos de transfecção *in vitro* que se seguiram.

A internalização celular dos vetores foi verificada através de *live cell imaging* e para comparar a eficiência de transfecção foram realizados estudos com diferentes *end-points* de transfecção. Foi demonstrado que ambos os vetores possuíam a capacidade de atravessar a membrana celular e entrar no núcleo, no entanto, o mcDNA-p53 foi o vetor que apresentou maior eficiência de transfecção. Através de RT-PCR, foi comprovado o sucesso da transcrição do gene de interesse transportado pelos vetores utilizados. Através de Western Blot, verificou-se que a expressão de proteína p53 era maior em células transfectadas com mcDNA-p53 quando comparada com células transfectadas com PP-p53. Estes resultados também foram comprovados pela quantificação de proteína p53 através do ensaio ELISA, concordando com o facto de que o vetor que permite uma maior eficiência de transfecção, também vai dar origem a um maior número de transcritos e da respetiva proteína alvo.

Através da contagem do número de células viáveis ao longo do tempo, foi possível verificar que o mcDNA-p53 provocou maior inibição da proliferação celular que o PP-p53. A mesma tendência foi observada nos estudos de viabilidade de células cancerígenas com resazurina. Os resultados da viabilidade celular obtidos com Fibroblastos indicaram que os vetores utilizados não causam efeitos citotóxicos, no entanto, a diferença observada entre os dois vetores pode estar relacionada com o processo de purificação aplicado em cada situação, sugerindo que o vetor de mcDNA-p53 apresenta menor conteúdo de impurezas que se reflete numa maior viabilidade celular. Considerando estas evidências, futuramente poderá ser avaliado o grau de pureza do mcDNA-p53 obtido pela estratégia de cromatografia de filtração em gel, realizando a quantificação de impurezas como DNA genómico, proteínas e endotoxinas. Por último, foi avaliada a indução da apoptose, confirmando que os níveis aumentados de proteína p53 avaliados anteriormente induzem a morte celular programada. Mais uma vez, o vetor de mcDNA-p53 apresentou resultados mais promissores em comparação com o PP-p53. Futuramente, também se poderá confirmar a ativação da via da apoptose mediada pela proteína p53, através da deteção de proteínas pró-apoptóticas como Bcl-2 e BAX.

Deste modo, a primeira parte deste trabalho permitiu verificar que o vetor de DNA minicircular é mais eficiente e vantajoso do que o vetor de DNA plasmídico para futuras aplicações em terapia génica. A ativação da apoptose em células cancerígenas pelo mcDNA-p53 mostra a potencial aplicação deste vetor no tratamento do cancro do colo do útero.

Numa segunda vertente deste trabalho de mestrado, foi realizada a construção de um vetor de mcDNA multigénico, com clonagem de dois genes terapêuticos no PP, nomeadamente com o gene p53 e com o gene pri-miRNA-375. As células *E. coli* ZYCY10P3S2T foram transformadas com o vetor multigénico e foi confirmada a presença dos dois genes terapêuticos por PCR. Os resultados obtidos através do estudo preliminar de transfecção *in vitro* em células CaSki, mostraram um aumento dos níveis de transcritos de p53, proveniente da ação do promotor CMV7. Contudo, a alteração dos níveis de transcritos dos oncogenes E6 e E7 não foi tão notória, sendo importante fazer futuramente uma avaliação ao longo do tempo, de modo a comprovar a influência do miRNA-375 e compreender a diferença de expressão entre os promotores CMV7 e EF1.

Considerando o elevado potencial terapêutico deste vetor multigénico, futuramente também poderão ser realizados estudos comparativos com vetores de mcDNA contendo cada gene individual, no sentido de verificar se este vetor multigénico é mais eficaz ao induzir dois mecanismos de ação anticancerígena em simultâneo.



# Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

1. Basu, P., Mittal, S., Bhadra Vale, D., & Chami Kharaji, Y. Secondary prevention of cervical cancer. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 47, 73-85 (2018).
2. Husain, R.S.A., & Ramakrishnan, V. Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. *Annals of Global Health*. 81, 675-683 (2015).
3. Jung, H.S., Rajasekaran, N., Ju, W., & Shin, Y.K. Human Papillomavirus: Current and Future RNAi Therapeutic Strategies for Cervical Cancer. *Journal of Clinical Medicine*. 4, 1126-1155 (2015).
4. IARC (2018). Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
5. Choi, Y.J., & Park, J.S. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. *Journal of Gynecologic Oncology*. 27, 1-12 (2016).
6. Ling, C., & Thierry, F. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. *Microbial Pathogenesis*. 58, 55-65 (2013).
7. Lee, S., Yang, A., Wu, T., & Hung, C. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *Journal of Gynecologic Oncology*. 27, 1-17 (2016).
8. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 110, 525-541 (2006).
9. Park, T., Fujiwara, H., Ph, D., & Wrigf, T.C. Molecular Biology of Cervical Cancer and its Precursors. *Cancer*. 76, 1902-1913 (1995).
10. Smiles, W.J., & Camera, D.M. The guardian of the genome p53 regulates exercise-induced mitochondrial plasticity beyond organelle biogenesis. *Acta Physiologica*. 222, 1-13 (2017).
11. Baugh, E.H., Ke, H., Levine, A.J., Bonneau, R.A., & Chan, C.S. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death and Differentiation*. 25, 154-160 (2018).
12. Parrales, A., & Iwakuma, T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. 5, 1-13 (2015).
13. Bouchet, B.P., Fromental, C.C. De, Puisieux, A., & Mar, C. p53 as a target for anti-cancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 58, 190-207 (2006).

14. Duffy, M.J., Synnott, N.C., & Crown, J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *European Journal of Cancer*. 83, 258-265 (2017).
15. Hong, B., van den Heuvel, a P.J., Prabhu, V. V, Zhang, S., & El-Deiry, W.S. Targeting Tumor Suppressor p53 for Cancer Therapy: Strategies, Challenges and Opportunities. *Current Drug Targets*. 15, 80-89 (2014).
16. Deiliis, J.A. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: Pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *International Journal of Obesity*. 40, 88-101 (2016).
17. Chen, B., Li, H., Zeng, X., Yang, P., Liu, X., Zhao, X., & Liang, S. Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *Journal of Translational Medicine*. 10, 228-240 (2012).
18. Sun, B.K., & Tsao, H. Small RNAs in development and disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 59, 725-737 (2008).
19. Wang, F., Li, Y., Zhou, J., Xu, J., Peng, C., Ye, F., Shen, Y., Lu, W., Wan, X., & Xie, X. miR-375 is down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1. *American Journal of Pathology*. 179, 2580-2588 (2011).
20. Yan, J.W., Lin, J.S., & He, X.X. The emerging role of miR-375 in cancer. *International Journal of Cancer*. 135, 1011-1018 (2014).
21. Yu, X., Zhao, W., Yang, X., Wang, Z., & Hao, M. miR-375 Affects the Proliferation, Invasion, and Apoptosis of HPV16-Positive Human Cervical Cancer Cells by Targeting IGF-1R. *International Journal of Gynecological Cancer*. 26, 851-858 (2016).
22. Jung, H.M., Phillips, B.L., & Chan, E.K.L. miR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6/E7, E6AP, CIP2A, and 14-3-3 $\zeta$ . *Molecular Cancer*. 13, 13-80 (2014).
23. Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T.C., & Hung, C. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 10, 3153-3164 (2014).
24. Venuti, A., Curzio, G., Mariani, L., & Paolini, F. Immunotherapy of HPV - associated cancer : DNA / plant - derived vaccines and new orthotopic mouse models. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 64, 1329-1338 (2015).
25. Schiller, J.T., & Müller, M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Lancet Oncology*. 16, 217-225 (2015).
26. Saade, F., & Petrovsky, N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 11, 189-209 (2012).
27. Stachyra, A., Góra-sochacka, A., & Sirko, A. DNA vaccines against influenza. *Acta Biochimica Polonica*. 61, 515-522 (2014).

28. Wang, W., Li, W., Ma, N., & Steinhoff, G. Non-Viral Gene Delivery Methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 14, 46-60 (2013).
29. Bouard, D., Alazard-Dany, N., & Cosset, F. Viral vectors: from virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology*. 157, 153-165 (2009).
30. Wirth, T., Parker, N., & Ylä-herttua, S. History of gene therapy. *Gene*. 525, 162-169 (2013).
31. Wiley (2018). Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Disponível em: <http://www.abedia.com/wiley/>.
32. Ibraheem, D., Elaissari, A., & Fessi, H. Gene therapy and DNA delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 459, 70-83 (2014).
33. Naldini, L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*. 526, 351-360 (2015).
34. Nafissi, N., Alqawlaq, S., Lee, E.A., Foldvari, M., Spagnuolo, P.A., & Slavcev, R.A. DNA ministrings: Highly Safe and Effective Gene Delivery Vectors. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 3, e165 (2014).
35. Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., & Anderson, D.G. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*. 15, 541-555 (2014).
36. Rubanyi, G.M. The future of human gene therapy. *Molecular Aspects of Medicine*. 22, 113-142 (2001).
37. Phillips, A.J. The challenge of gene therapy and DNA delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53, 1169-1174 (2001).
38. Lundstrom, K. Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases*. 6, 42-62 (2018).
39. Gao, X., Kim, K.S., & Liu, D. Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next. *The AAPS Journal*. 9, 92-104 (2007).
40. Ramamoorth, M., & Narvekar, A. Non Viral Vectors in Gene Therapy - An Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9, 1-6 (2015).
41. Kado, C.I. Historical Events That Spawned the Field of Plasmid Biology. *Microbiology Spectrum*. 2, 3-11 (2014).
42. Gaspar, V.M., Cruz, C., Queiroz, A., Pichon, C., Correia, J., & Sousa, F. Sensitive Detection of Peptide - Minicircle DNA Interactions by Surface Plasmon Resonance. *Analytical Chemistry*. 85, 2304-2311 (2013).
43. Ghanem, A., Healey, R., & Adly, F.G. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta*. 760, 1-15 (2013).
44. Abdulrahman, A., & Ghanem, A. Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta*. 1025, 41-57 (2018).

45. Sousa, Â., Sousa, F., & Queiroz, J.A. Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA. *Journal of Separation Science*. 35, 3046-3058 (2012).
46. Sousa, F., Prazeres, D.M.F., & Queiroz, J.A. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends in Biotechnology*. 26, 518-525 (2008).
47. Monteiro, G.A., Cabral, J.M.S., Ferreira, G.N.M., & Prazeres, D.M.F. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends in Biotechnology*. 18, 380-388 (2000).
48. Carnes, A., & Williams, J. Plasmid DNA Manufacturing Technology. *Recent Patents on Biotechnology*. 1, 151-166 (2007).
49. Diogo, M.M., Queiroz, J.A., & Prazeres, D.M.F. Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*. 1069, 3-22 (2005).
50. Sousa, F., Passarinha, L., & Queiroz, J.A. Biomedical application of plasmid DNA in gene therapy: A new challenge for chromatography. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 26, 83-116 (2009).
51. Hoffman, M.M., Khrapov, M.A., Cox, J.C., Yao, J., Tong, L., & Ellington, A.D. AANT: The Amino Acid-Nucleotide Interaction Database. *Nucleic Acids Research*. 32, 174-181 (2004).
52. Luscombe, N.M. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Research*. 29, 2860-2874 (2001).
53. Sousa, F., Freitas, S., Azzoni, A.R., Prazeres, D.M.F., & Queiroz, J. Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 45, 131-140 (2006).
54. Sousa, A., Sousa, F., & Queiroz, J.A. Impact of lysine-affinity chromatography on supercoiled plasmid DNA purification. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 879, 3507-3515 (2011).
55. Sousa, F., Prazeres, D.M.F., & Queiroz, J.A. Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *The Journal of Gene Medicine*. 11, 79-88 (2009).
56. Masini, J.C., & Svec, F. Porous monoliths for on-line sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*. 964, 24-44 (2017).
57. Pfau Miller, E.L., Paulemond, M.L., Dupper, C.M., & Hage, D.S. Affinity monolith chromatography: A review of principles and recent analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405, 2133-2145 (2013).

58. Sousa, Â., Tomaz, C.T., Sousa, F., & Queiroz, J.A. Successful application of monolithic innovative technology using a carbonyldiimidazole disk to purify supercoiled plasmid DNA suitable for pharmaceutical applications. *Journal of Chromatography A*. 1218, 8333-8343 (2011).
59. Beek, T.A. Van. Bioaffinity chromatography on monolithic supports. *Journal of Separation Science*. 33, 422-438 (2010).
60. Josic, D., & Clifton, J.G. Use of monolithic supports in proteomics technology. *Journal of Chromatography A*. 1144, 2-13 (2007).
61. Soares, A., Queiroz, J.A., Sousa, F., & Sousa, A. Purification of human papillomavirus 16 E6/E7 plasmid deoxyribonucleic acid-based vaccine using an arginine modified monolithic support. *Journal of Chromatography A*. 1320, 72-79 (2013).
62. Amorim, L.F.A., Gaspar, R., Pereira, P., Černigoj, U., Sousa, F., Queiroz, J.A., & Sousa, Â. Chromatographic HPV-16 E6/E7 plasmid vaccine purification employing L-histidine and 1-benzyl-L-histidine affinity ligands. *Electrophoresis*. 38, 2975-2980 (2017).
63. Nafissi, N., & Foldvari, M. Neuroprotective therapies in glaucoma: II . Genetic nanotechnology tools. *Frontiers in Neuroscience*. 9, 1-16 (2015).
64. Vítor M. Gaspar, Maia, C.J., Queiroz, J.A., Pichon, C., Correia, I.J., & Sousa, F. Improved Minicircle DNA Biosynthesis for Gene Therapy Applications. *Human Gene Therapy Methods*. 24, 93-105 (2014).
65. Mayrhofer, P., Blaesen, M., Schleef, M., & Jechlinger, W. Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography. *The Journal of Gene Medicine*. 10, 1253-1269 (2008).
66. Cozzarelli, N.R., Kelly, R.B., & Kornberg, A. A minute circular DNA from *Escherichia coli* 15\*. *Biochemistry*. 60, 992-999 (1968).
67. Melo-diogo, D., Costa, E., Sousa, F., & Pichon, C. Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 15, 353-379 (2015).
68. Chen, Z., He, C.-Y., & Kay, M.A. Improved Production and Purification of Minicircle DNA Vector Free of Plasmid Bacterial Sequences and Capable of Persistent Transgene Expression In Vivo. *Human Gene Therapy*. 16, 126-131 (2005).
69. Diamantino, T., Pereira, P., Queiroz, J.A., Sousa, Â., & Sousa, F. Minicircle DNA purification using a CIM® DEAE-1 monolithic support. *Journal of Separation Science*. 39, 3544-3549 (2016).
70. Alves, C.P.A., Simčíková, M., Brito, L., Gabriel A. Monteiro, & Prazeres, D.M.F. Development of a nicking endonuclease-assisted method for the purification of minicircles. *Journal of Chromatography A*. 1443, 136-144 (2014).

71. Darquet, A., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D., & Crouzet, J. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Therapy*. 4, 1341-1349 (1997).
72. Mayrhofer, P., Schleef, M., & Jechlinger, W. Use of Minicircle Plasmids for Gene Therapy. *Methods in Molecular Biology*. 542, 87-104 (2009).
73. Hou, X.H., Guo, X.Y., Chen, Y., He, C.Y., & Chen, Z.Y. Increasing the minicircle DNA purity using an enhanced triplex DNA technology to eliminate DNA contaminants. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. 1, 14062 (2015).
74. Diogo, M.M., Queiroz, J.A., Monteiro, G.A., Martins, S.A.M., Ferreira, G.N.M., & Prazeres, D.M.F. Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*. 68, 576 (2000).
75. Antiabong, J.F., Ngoepe, M.G., & Abechi, A.S. Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. *Veterinary World*. 9, 935-939 (2016).
76. Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96, 23-28 (1990).
77. Amorim, L.F.A., Sousa, F., Queiroz, J.A., Cruz, C., & Sousa, Â. Screening of L-histidine-based ligands to modify monolithic supports and selectively purify the supercoiled plasmid DNA isoform. *Journal of Molecular Recognition*. 28, 349-358 (2015).
78. Caramelo-Nunes, C., Almeida, P., Marcos, J.C., & Tomaz, C.T. Aromatic ligands for plasmid deoxyribonucleic acid chromatographic analysis and purification: An overview. *Journal of Chromatography A*. 1327, 1-13 (2014).
79. Alves, C.P.A., Simčíková, M., Brito, L., Monteiro, G.A., & Prazeres, D.M.F. Development of a nicking endonuclease-assisted method for the purification of minicircles. *Journal of Chromatography A*. 1443, 136-144 (2016).
80. Kobelt, D., Schleef, M., Schmeer, M., Aumann, J., Schlag, P.M., & Walther, W. Performance of High Quality Minicircle DNA for In Vitro and In Vivo Gene Transfer. *Molecular Biotechnology*. 53, 80-89 (2013).
81. Hornstein, B.D., Roman, D., Arévalo-Soliz, L.M., Engevik, M.A., & Zechiedrich, L. Effects of Circular DNA Length on Transfection Efficiency by Electroporation into HeLa Cells. *PLoS One*. 11, 1-17 (2016).
82. Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J., & Pitard, B. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Research*. 27, 3792-3798 (1999).

83. Yin, W., Xiang, P., & Li, Q. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. *Analytical Biochemistry*. 346, 289-294 (2005).
84. Yi, J.W., Jang, M., Kim, S.J., Kim, S.S., & Rhee, J.E. Degradation of p53 by natural variants of the E6 protein of human papillomavirus type 16. *Oncology Reports*. 29, 1617-1622 (2013).
85. Ferguson, R.E., Carroll, H.P., Harris, A., Maher, E.R., Selby, P.J., & Banks, R.E. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*. 5, 566-571 (2005).
86. Rivero-Gutiérrez, B., Anzola, A., Martínez-Augustin, O., & De Medina, F.S. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Analytical Biochemistry*. 467, 1-3 (2014).
87. Costa, D., Costa, C., Caldeira, M., Cortes, L., Queiroz, J.A., & Cruz, C. Targeting of Cellular Organelles by Fluorescent Plasmid DNA Nanoparticles. *Biomacromolecules*. 18, 2928-2936 (2017).
88. Misra, S.K., Naz, S., Kondaiah, P., & Bhattacharya, S. A cationic cholesterol based nanocarrier for the delivery of p53-EGFP-C3 plasmid to cancer cells. *Biomaterials*. 35, 1334-1346 (2014).
89. Reinhardt, H.C., & Schumacher, B. The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends in Genetics*. 28, 128-136 (2012).
90. Costa, D., Valente, A.J.M., Miguel, M.G., & Queiroz, J. Plasmid DNA microgels for drug/gene co-delivery: A promising approach for cancer therapy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 442, 181-190 (2014).
91. Gaspar, V.M., Correia, I.J., Sousa, Â., Silva, F., Paquete, C.M., Queiroz, J.A., & Sousa, F. Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy. *Journal of Controlled Release*. 156, 212-222 (2011).
92. Chan, W., Verma, C.S., Lane, D.P., & Gan, S.K. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Bioscience Reports*. 33, 931-937 (2013).
93. Zhang, G., Gurtu, V., & Kain, S.R. An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells. *Biochemical Biophysics Research Community*. 227, 707-711 (1996).
94. Zhao, Q.-Q., Chen, J.-L., Lv, T.-F., He, C.-X., Tang, G.-P., Liang, W.-Q., Tabata, Y., & Gao, J.-Q. N/P Ratio Significantly Influences the Transfection Efficiency and Cytotoxicity of a Polyethylenimine/Chitosan/DNA Complex. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 32, 706-710 (2009).



# ANEXO I

**Comunicação de poster** no 12º Simpósio Internacional “European Society of Biochemical Engineering Sciences” (ESBES), Lisboa (2018): Dalinda Eusébio, Ana M. Almeida, Joel Alves, Cláudio J. Maia, João A. Queiroz, Fani Sousa, Ângela Sousa. Recombinant p53-minicircular DNA: from vector construction to biopharmaceutical purification.

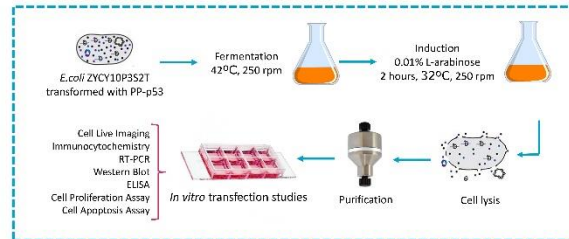
## Recombinant p53-minicircular DNA: from vector construction to biopharmaceutical purification

Dalinda Eusébio, Ana M. Almeida, Joel Alves, Cláudio J. Maia, João A. Queiroz, Fani Sousa, Ângela Sousa  
CICS-UBI, Faculty of Health Science, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

### INTRODUCTION

- Human Papillomavirus (HPV) is considered the main causative agent for the development of cervical cancer since E6 oncoprotein targets the p53 tumor suppressor protein for degradation.
- Minicircle DNA (mcDNA) is a small eukaryotic expression vector that results from an *in vivo* site-specific recombination process, in which a parental plasmid (PP) leads to the formation of a miniplasmid (mP), carrying the undesired backbone sequences, and a mcDNA, carrying the therapeutic expression cassette.
- The purpose of this work is to develop a biotechnological process to construct, produce and purify a mcDNA encoding for p53. Moreover, this work aims to compare the transfection efficiency and the therapeutic effect of both vectors through *in vitro* studies, looking forward to develop a potential therapeutic approach for cervical cancer by re-establishing the p53 levels in cancer cells.

### METHODS



### RESULTS

#### AFFINITY CHROMATOGRAPHY

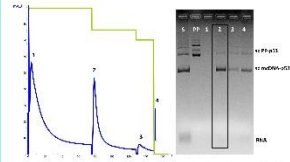


Figure 1 - Purification of mcDNA-p53 with L-histidine monolith:  
1 - 5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2 - 2.55M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;  
3 - 2.38M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4 - 0M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Buffer: 10 mM citrate-EDTA, pH 5.0; Loop: 100 µl.  
The best result was obtained using a pre-purified sample, where sc mcDNA-p53 was mainly recovered in the second peak.

#### TRANSFECTION EFFICIENCY

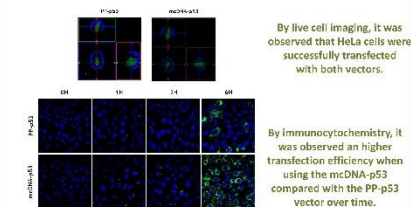


Figure 2 - Confocal microscopy of HeLa cells transfected with different FITC-labeled vectors. The cell nuclei are represented in blue staining and FITC-labeled vectors are represented in green staining.

#### RT-PCR

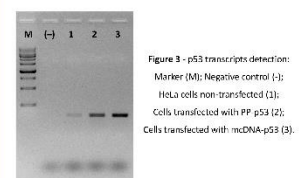


Figure 3 - p53 transcripts detection:  
Marker (M); Negative control (-);  
HeLa cells non-transfected (1);  
Cells transfected with PP-p53 (2);  
Cells transfected with mcDNA-p53 (3).  
After 24 hours of transfection, the level of p53 transcripts was higher in cells transfected with mcDNA-p53 in comparison to cells transfected with PP-p53.

#### WESTERN BLOT

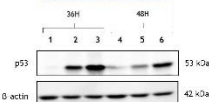


Figure 4 - Western blot for p53 protein expression:  
HeLa cells non-transfected (1) (4);  
Cells transfected with PP-p53 (2) (5);  
Cells transfected with mcDNA-p53 (3) (6).  
After 36 and 48 hours of transfection, the p53 protein expression was higher in cells transfected with mcDNA-p53.

#### ELISA

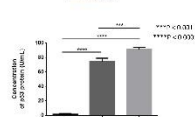


Figure 5 - Quantification of p53 protein expression in HeLa cells, using a p53 ELISA Kit. Data represent the average of 4 independent experiments.  
After 36 hours of transfection, the concentration of p53 protein was higher in cells transfected with mcDNA-p53.

#### CELL PROLIFERATION ASSAY

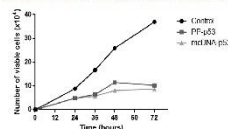


Figure 6 - Cell proliferation assay in HeLa cells transfected with PP-p53 and mcDNA-p53. Data represent the average of 3 independent experiments.  
It was found that the growth rate of HeLa cells transfected with PP-p53 and mcDNA-p53 was significantly inhibited, in comparison with control cells.

#### CELL APOPTOSIS ASSAY

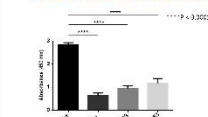


Figure 7 - Cell apoptosis assay in HeLa cells transfected with PP-p53 and mcDNA-p53. Data represent the average of 3 independent experiments.  
After 48 hours of transfection, cell apoptosis was enhanced with mcDNA-p53 and PP-p53.

### CONCLUSIONS

- sc mcDNA-p53 recovery has to be sacrificed to guaranty the required purity
  - Higher transfection efficiency was achieved with mcDNA-p53 vector
- p53 transcripts and protein expression levels were higher in cells transfected with mcDNA-p53
  - Proliferation rate was significantly decreased, followed by an increase on cells apoptosis
- mcDNA presents a promising alternative to standard plasmid DNA (pDNA) for anticancer therapy

### ACKNOWLEDGEMENTS

Ana M. Almeida and Ângela Sousa acknowledge the doctoral and post-doctoral fellowships (SFRH/BD/102284/2014 and SFRH/BPD/102716/2014, respectively) from FCT. The authors acknowledge to BIA Separations for having kindly provided the monolithic disc.



# ANEXO II

**Comunicação de poster** no XIII Simpósio Anual do CICS-UBI, Covilhã (2018): Dalinda Eusébio, Ana M. Almeida, Joel Alves, Cláudio J. Maia, João A. Queiroz, Fani Sousa, Ângela Sousa. Recombinant p53-minicircular DNA: biopharmaceutical purification and re-establishing of the p53 levels in cancer cells.



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



FACULDADE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE

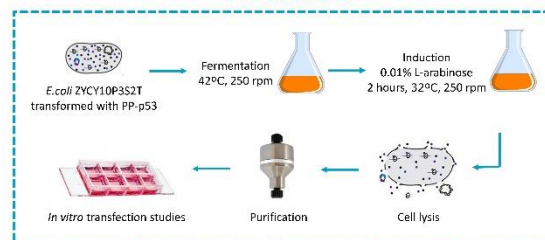
## Recombinant p53-minicircular DNA: biopharmaceutical purification and re-establishing of the p53 levels in cancer cells

**Dalinda Eusébio, Ana M. Almeida, Joel Alves, Cláudio J. Maia, João A. Queiroz, Fani Sousa, Ângela Sousa**  
CICS-UBI, Faculty of Health Science, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

### INTRODUCTION

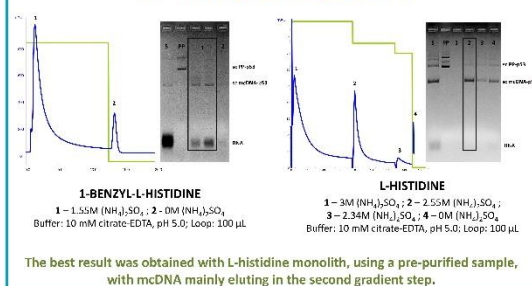
- Human Papillomavirus (HPV) is considered the main causative agent for the development of cervical cancer since E6 oncoprotein targets the p53 tumor suppressor protein for degradation.
- Minicircle DNA (mcDNA) is a small eukaryotic expression vector that results from an *in vivo* site-specific recombination process, in which a parental plasmid (PP) leads to the formation of a miniplasmid (mP), carrying the undesired backbone sequences, and a mcDNA, carrying the therapeutic expression cassette.
- The purpose of this work is to purify a mcDNA encoding for p53, aiming to develop a potential therapeutic approach for cervical cancer by re-establishing the p53 levels in cancer cells.

### METHODS

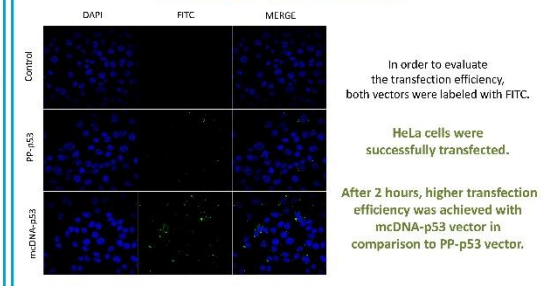


### RESULTS

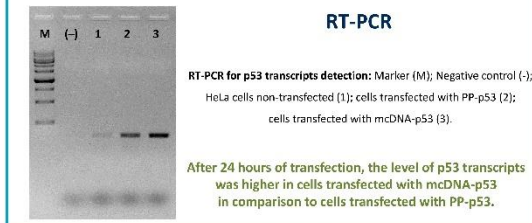
#### AFFINITY CHROMATOGRAPHY



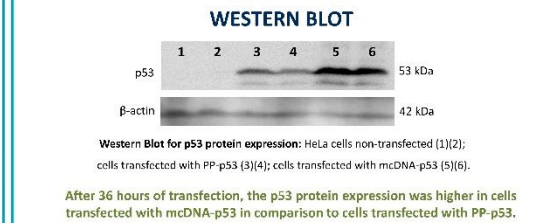
#### TRANSFECTION EFFICIENCY



#### RT-PCR



#### WESTERN BLOT



### CONCLUSIONS

- L-histidine monolith presents more selectivity towards mcDNA than 1-benzyl-L-histidine monolith
  - sc mcDNA-p53 recovery has to be sacrificed to guaranty the required purity
  - Higher transfection efficiency was achieved with mcDNA-p53 vector
- p53 transcripts and protein expression levels were higher after cells transfection with mcDNA-p53 vector
  - mcDNA presents a promising alternative to standard plasmid DNA (pDNA)

### ACKNOWLEDGEMENTS

Ana M. Almeida and Ângela Sousa acknowledge the doctoral and post-doctoral fellowships (SFRH/BD/102284/2014 and SFRH/BPD/102716/2014, respectively) from FCT. The authors acknowledge to BIA Separations for having kindly provided the monolithic discs.







GAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAACCTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATT  
 TTTCACCTGCATTCTAGTGTGGTGTGTCCTCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCC  
 ATTCTCCGCCCTCCCGCCCTAACTCGGCCAATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAG  
 AAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGACTTTTGCAGATCGACCCATGGGGGCCGCCCAACTGGGTAACCTTTGAGTCTCTCAGTTGGG  
 GTAATCAGCATCATGATGTTGGTACCACATCATGATGCTGATTATAAGAATGCGGCCGCCACACTTAGTGGATCTCGAGTTAATAATCAGAGA  
 CGTCAAGAAGCGGATAGAAAGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCAGGAAAGCGGTGAGCCATTCGCCGCCAAGCTCTCA  
 GCAATATCACGGGTAGCCAAAGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCCGATGAATCCGAAAAGCGGCCATTTTCCACCAT  
 GATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTGGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGAGCC  
 CCTGATGCTCTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTGGTGGTGAATGGG  
 CAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGACGCGCCGATGTCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGCAGGAGCAAGGTGATAGATGACATGGAGATCTGC  
 CCGGGCACTTCGCCCAATAGCAGCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCGTGTTGGCCAGCCAGATAG  
 CCGGCTGCCTCGTCTTGCAGTTCATTGAGGGCACCGACAGTCCGCTTGCACAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACAGCGCGG  
 CATCAGAGCAGCCGATTGCTGTGTTGGCCAGTCTAGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGCCGAGAACCTGGGTGCAATCCATCTTGTTCAAATC  
 ATGCGAAACGATCCTCATCTGCTCTTGTATCAGAGCTTGTATCCCTGCGCCATCAGATCCTTGGCGCGAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAAGG  
 CTTCCAACTTACAGAGGGGCCCGCCAGCTGGCAATTCGGTTCGCTTGTCTTCCATAAAAACCGCCAGTCTAGCTATGCCATGTAAGCCACTGCG  
 AAGCTACCTGCTTTCTTTTCCGCTTGGCTTTCCCTTGTCCAGATAGCCAGTACGTGACATTCATCCGGGTGAGCAGCCGTTCTGCGACTGGCT  
 TTCTAGTGTCTCGAGGGGGCCAAACGCTCTCCAGCTTGGCTGTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGACGCGAGA  
 AGCGTCTGATAAAAACAGAAATTTGCTGGCGGCAAGTGGCGGTTGGTCCCACTGACCCCATGCCGAATCAGAAAGTGAACGCCGTAGCGCGATGG  
 TAGTGTGGGGTCTCCCATCGAGAGTAGGGAACTGCCAGCATCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTCGTTTTATCTGTTGT  
 TTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGCAAAATCCGCCGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCC  
 ATAACTGCCAGGCATCAAAATTAAGCAGAAAGCCATCCTGACGGATGGCTTTTGGCTTCTACAAACTCTTTGTTTATTTCTAAATACATTC  
 AATATGATCCGCTCATGACCAAAATCCCTTAAGTGTAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCC  
 TTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAACAAAAACCCGCTACACGGGTGGTTTGTGTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGA  
 AGGTAACCTGGCTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATCTGCTCTTCTAGTGTAGCCGTAAGTGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACA  
 TACCTCGCTGCTAATCCTGTACCAGTGGCTGTCAGTGGCGATAAGTGTGCTTACCGGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG  
 GCAGCGTGGGGTGAACGGGGGTTGCTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAATCAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAA  
 GCGCCACGCTTCCGAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCC  
 TGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTCCCACTCTGACTTGAAGTGGATTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGGGAGCCATGGAAGAAACCGCCAG  
 CAACGGGCTTTTACGGTTCCTGGCTTTTGGCTGGCTTTTGGCTCACATGTTCTTCCGCTTATCCCTGATTCTGTGATAACCGTATACCG  
 CCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGACCGAACCAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGGAGAACGGGAAGAGCGCCTGATGGGATTTTCTC  
 CTACGATCTGTGGGATTTTACACCGCATATGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCG  
 CTACGTGACTGGGTGATGGTGGCCCGACACCCGCCAACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGC  
 TGTGACCGTCTCCGGAGTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCAATCCGAAACCGCGAGGAGCAGATCAATTCGCGCGGAAGGCGAAGCGCG  
 ATGATAATGTGCTGTCAAATGGACGAAGCAGGATCTGCAAAACCTATGCTACTCCGTCAGCCGTCAATTTGTGATTGTTACCAATATGAC  
 AACTTACGCGTACATCACTTTTCTTCAACAACCGGACGGAACCTCGCTCGGGCTGGCCCGGTCATTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAG  
 TTGATCGTCAAAACCAACTTGGACCGACCGTGGGATAGGATCCGGTGGTGTCTCAAAAGCAGCTTCCGCTGGCTGATAGTTGGTCTCCGCGCC  
 AGCTTAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAACATGCTGTGGACGCTGGCGAT

Promotor CMV

Proteina P53

Promotor EF

Proteina GFP

NZYTech, Lda.  
 Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar,  
 Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal  
 Telefone: +351.213643514  
[www.nzytech.com](http://www.nzytech.com)



CCGCGCTGCCTCGTCTTGACAGTTCAATCAGGGCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGG  
 CATCAGAGCAGCCGATTGCTGTGGTGGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCAGGCGCCGAGAACCTGGGTGCAATCCATCTTGTTCAATC  
 ATGCGAAACGATCCTCATCTGCTCTCTTGATCAGAGCTTGATCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGCGGCGGAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAGGG  
 CTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCAGCTGGCAATTCGGTTCGCTTGCTGTCCATAAAACCGCCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAAGCCACTGC  
 AAGTACCTGCTTTCTCTTTGCGCTTGCGTTTTCCCTTGTCAGATAGCCAGTAGCTGACATTCAATCCGGGGTCCAGCACCGTTTTCTGCGGACTGGCT  
 TTCTACGTGCTCGAGGGGGCCAAACGCTCTCCAGCTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAGATTTTCCAGCTGATACAGATTAATCAGAACGCAGA  
 AGCGGTCTGATAAAACAGAAATTTGCCTGGCGGCGTAGCGGCTGGTCCCCTGACCCCATGCCAACTCAGAAGTGAACGCCGTAGCGCCGATGG  
 TAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTCGTTTTATCTGTTGT  
 TTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCC  
 AATAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAAGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTGGCTTCTACAAACTCTTTGTTATTTTCTAAATACATCA  
 AATATGATCCGCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTCTTGAGATCC  
 TTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA  
 AGGTAACGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGCTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACTCTGAGCAGCCCTACA  
 TACCTCGCTGCTAATCTGTACCACTGGCTGCGCAGTGGCGATAAGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGC  
 GCAGCGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGSAGCGAACGACTACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGCTATGAGAAA  
 GCGCCAGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCC  
 TGGTATCTTATAGTCTCTGGGTTTCCGCCCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGAAGAACGCCAG  
 CAACGGGCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCCGCTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCG  
 CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCGAACCAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAAGCGGAAGAGCGCTGATGGGTATTTCTC  
 CTACGCATCTGCGGATTTTACACCGCATATGTTGCACTCTCAGTACAATCTGCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCG  
 CTACGTGACTGGGTCATGGCTGGCCCGACACCCGCCAACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGC  
 TGTGACCGTCTCCGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTACCGCTCATACCGAAACGCGGAGGAGCAGATCAATTCGCGCGAAGGCGAAGCGCG  
 ATGATAATGTGCTGTCAAATGGAGGAGCAGGATTTGCAAACTATGCTACTCCGTCAGCCGTCAATTTGTGATTGTTACCAATATGAC  
 AACTTGACGGTACATCACTTTTTCTTCAACCGGCAOGGAACTCGCTGGGCTGGCCCGGTGCATTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAG  
 TTGATCGTCAAACCAACATGCGACCGACGGTGGGATAGGCATCCGGTGGTGTCAAAGCAGCTTCGCTGCTGATACGTGTTGCTCCTCGCGCC  
 AGCTTAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGAAAAGATGTACAGACGCGACGGCGACAAGCAACATGCTGTGCGACGCTGGCGAT

Promotor CMV  
 Proteina P53  
 Promotor EF  
 Proteina GFP  
 EcoRV  
 ScaI

**Sequencing Results**

```

WT      CCAAGCTGTGACCGGCGCTACGCTAGACGCCACCATGGAGAGCGACGAGAGCGGCTGC
seq     CCAAGCTGTGACCGGCGCTACGATATCGGCCACCATGGAGAGCGACGAGAGCGGCTGC
***** ** *****

WT      CCGCCATGGAGATCGAGTGCCGCATCACCGGCACCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGG
seq     CCGCCATGGAGATCGAGTGCCGCATCACCGGCACCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGG
*****

WT      TGGGCGGCGGAGAGGGCACCCCAAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCA
seq     TGGGCGGCGGAGAGGGCACCCCAAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCA
*****

WT      AAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACC
seq     AAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACC
*****

WT      ACTTCGGCACCTACCCAGCGGCTACGAGAACCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCG
seq     ACTTCGGCACCTACCCAGCGGCTACGAGAACCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCG
*****

WT      GCTACACCAACCCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGCACGTGAGCTTCA
seq     GCTACACCAACCCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGCACGTGAGCTTCA
*****

WT      GCTACCGCTACGAGGCGGCGCGTGTGATCGGCGACTTCAAGGTGGTGGGCACCGGCTCC
seq     GCTACCGCTACGAGGCGGCGCGTGTGATCGGCGACTTCAAGGTGGTGGGCACCGGCTCC
*****

WT      CCGAGGACAGCGTGATCTTACCGACAAGATCATCCGAGCAACGCCACCGTGGAGCACC
seq     CCGAGGACAGCGTGATCTTACCGACAAGATCATCCGAGCAACGCCACCGTGGAGCACC
*****

WT      TGCACCCCATGGGCGATAACGTGCTGGTGGGCGAGCTTCGCCCGCACCTTCAGCCTGCGG
seq     TGCACCCCATGGGCGATAACGTGCTGGTGGGCGAGCTTCGCCCGCACCTTCAGCCTGCGG
*****

WT      ACGGCGGCTACTACAGCTTCGTGGTGGGACAGCCACATGCACTTCAAGAGCGCCATCCACC
seq     ACGGCGGCTACTACAGCTTCGTGGTGGGACAGCCACATGCACTTCAAGAGCGCCATCCACC
*****

WT      CCAGCATCCTGCAGAACGGGGGCCCATGTTGCGCTTCCGCCGCGTGGAGGAGCTGCACA
seq     CCAGCATCCTGCAGAACGGGGGCCCATGTTGCGCTTCCGCCGCGTGGAGGAGCTGCACA
*****

WT      GCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCAGCCTTCAAGACCCCATCGCCTTCG
seq     GCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCAGCCTTCAAGACCCCATCGCCTTCG
*****

WT      CCAGATCCCAGCTCAGTCTCAATTCTGCCGTGGACGGCACCGCCGACCCGGCTCCA
seq     CCAGATCCCAGCTCAGTCTCAATTCTGCCGTGGACGGCACCGCCGACCCGGCTCCA
*****

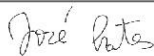
WT      CCGGATCTCGTAAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG
seq     CCGGATCTCGTAAGTACTCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG
*****

```

**Certificate of Analysis**

<b>Test</b>	<b>Result</b>
Sanger Sequencing	Pass
Sequencing Alignment	Pass
DNA Quality (Miniprep: 0.5-1 µg, OD260/280 =1.7~2.0). Free of contamination	Pass

Approved by:



José Prates  
Senior Manager, Quality Systems

Revised 10/17

# ANEXO IV

Relatório de clonagem do fragmento pri-miRNA-375 no vetor PP-p53 mutado.

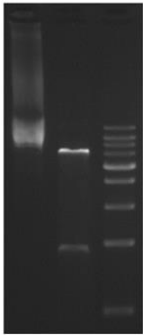
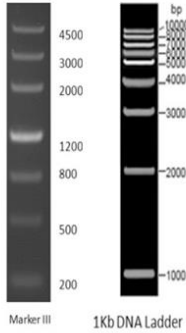
## GENESYNTHESISREPORT

No. :ZG180235 -1

### Plasmid Information:

Work No.	Y0006840-1	Gene Name.	origene pri-mir-375,VEC-8222
Length(bp)	627	Order Date	2018/4/21 9:37:51
Vector	VEC-8222	Delivery Date.	2018-7-27
Plasmid No.	Y0006840-1-F77686	Storage	-20°C
Cloning Site.	EcoRV-ScaI	Host	Top10
Resistance.	Kan+	Plasmid Qty.	4ug /Vial
Note.	GeneCust keeps the bacterial stock of the plasmid and a copy of sequencing report for three months.		

### Restriction Enzyme Digestion Analysis:

Results	Description
	Enzyme: <b>EcoRV/XbaI</b> Expected Size: <b>1750/6322</b> Marker Ladder:  Marker III      1Kb DNA Ladder