

Otimização do bioprocesso de obtenção da vacina de DNA minicircular contra o cancro do colo do útero

Beatriz Morais Ferreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
2º ciclo de estudos

Orientador: Prof^a. Doutora Ângela Maria Almeida de Sousa
Co-orientador: Mestre Matilde Bogalheiro Costa

outubro de 2025

Declaração de Integridade

Eu, Beatriz Morais Ferreira, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M14362 de/o Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 11/10/2025

Beatriz Ferreira

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente
assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, expresso a minha gratidão à minha orientadora, Professora Doutora Ângela Sousa, pela dedicação e pela partilha de conhecimento científico ao longo deste ano. O seu acompanhamento foi determinante para a concretização deste trabalho, pelas sugestões, e pela avaliação crítica.

Gostaria também de agradecer à minha coorientadora, Matilde Costa, pela disponibilidade constante, pelo apoio prestado no laboratório e por me ajudar a colocar várias situações em perspetiva.

Agradeço à Universidade da Beira Interior, em especial ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste projeto, nomeadamente a disponibilização de infraestruturas, equipamentos e materiais necessários.

Aos meus colegas de laboratório, deixo o meu reconhecimento pela forma como me acolheram e pelo apoio sempre prestado, pela partilha de conhecimento e pela disponibilidade para ajudar. Um agradecimento especial à Fabiana Valente, que caminhou comigo lado a lado neste percurso. Obrigada pelos inúmeros cafés depois de almoço, pelas longas conversas que terminavam sempre em risos, e pelo apoio mútuo, foram momentos de descontração essenciais para me manter animada. À Rafaela Gaspar, agradeço as horas partilhadas em fermentações e os momentos de desespero conjunto quando as bactérias insistiam em não crescer.

À minha melhor amiga e colega de casa, Carolina Ferreira, obrigada por me ouvires e apoiares, não só neste ano, mas desde que chegámos à Covilhã, completamente perdidas. O teu apoio e a tua amizade foram fundamentais em todo o meu percurso académico.

Às minhas amigas Rita Santos e Lara Neto, obrigada pelos cafés (ou finos), pelas gargalhadas e por estarem sempre prontas a animar-me nos momentos em que mais precisei.

Aos meus pais, devo tudo. Obrigada por tornarem este percurso académico possível, por todos os esforços e sacrifícios, pelo apoio e pela compreensão, e por acreditarem sempre em mim. Ao meu irmão, agradeço por me fazer esquecer um bocadinho a agitação e frustração do dia a dia, com as suas piadas “diferenciadas”. Às minhas avós, obrigada pelo carinho e pelo orgulho que sempre demonstraram ter em mim.

Por último, a ti, David, agradeço pelo amor incondicional, pela amizade e pelo companheirismo. Obrigada por estares sempre ao meu lado, por me apoiares nos bons e maus momentos, por nunca me deixares cair e por acreditares em mim, mesmo quando eu duvidava.

Resumo

O cancro do colo do útero é um dos tumores mais prevalentes entre as mulheres a nível mundial, estando maioritariamente associado à infeção persistente pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV), sobretudo pelos genótipos de alto risco HPV-16 e HPV-18. Nestes casos, as oncoproteínas virais E6 e E7 desempenham um papel central na transformação maligna, ao promoverem a degradação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRB, respetivamente.

As vacinas de DNA têm emergido como uma estratégia promissora para a prevenção e tratamento de diversas doenças infecciosas e oncológicas. Esta abordagem baseia-se na introdução de DNA exógeno em células hospedeiras, com o objetivo de induzir a expressão de antígenos específicos capazes de desencadear uma resposta imunitária preventiva e terapêutica. Entre os vetores não virais utilizados, o DNA plasmídico (pDNA) tem sido o mais explorado, devido o seu baixo custo e facilidade de produção. No entanto, a presença de elementos bacterianos, como genes de resistência a antibióticos, pode desencadear respostas imunitárias indesejadas e reduzir a segurança da sua utilização.

Como alternativa, o DNA minicircular (mcDNA) constitui uma geração mais avançada de vetores, resultante de uma recombinação intramolecular do plasmídeo parental (PP) numa cultura bacteriana, que se divide em duas moléculas filhas, o miniplasmídeo (mP) (constituído somente pelos genes procariotas necessários durante o processo de produção) e o mcDNA (sendo formado exclusivamente pela cassette de expressão eucariótica). Esta característica confere-lhe vantagens significativas face ao pDNA convencional, incluindo maior segurança, menor dimensão, eficiência acrescida de transfeção, maior estabilidade intracelular e expressão génica mais duradoura, traduzindo-se num elevado potencial terapêutico. Contudo, a sua aplicação clínica requer o desenvolvimento de métodos de produção e purificação robustos, capazes de cumprir os requisitos das entidades reguladoras.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo explorar a cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) como estratégia para a purificação de pDNA e mcDNA. Numa primeira fase, foram estudadas as condições de separação entre pDNA e RNA, seguindo-se a avaliação da seletividade entre mcDNA e RNA. Observou-se que o mcDNA tende a eluir em fases mais precoces, o que pode estar associado à sua menor hidrofobicidade relativamente ao RNA.

Os ensaios de quantificação permitiram avaliar a pureza e recuperação dos vetores de DNA em função das estratégias exploradas, verificando a sua conformidade com os parâmetros definidos pelas agências reguladoras para as condições otimizadas. Contudo, não foi possível obter uma separação clara entre isoformas de DNA nem entre mcDNA e PP. Em suma, os resultados demonstram que a HIC constitui uma abordagem promissora para a purificação de mcDNA, fornecendo uma base sólida para otimizações futuras e para a consolidação deste vetor como ferramenta terapêutica de nova geração.

Palavras-chave

Cancro do colo do útero; Cromatografia de interação hidrofóbica; DNA minicircular; DNA plasmídico; HPV.

Abstract

Cervical cancer is one of the most prevalent malignancies among women worldwide, being predominantly associated with persistent infection by Human Papillomavirus (HPV), particularly the high-risk genotypes HPV-16 and HPV-18. In these cases, the viral oncoproteins E6 and E7 play a central role in malignant transformation by promoting the degradation of the tumor suppressor proteins p53 and pRB, respectively.

DNA vaccines have emerged as a promising strategy for the prevention and treatment of various infectious and oncological diseases. This approach is based on the introduction of exogenous DNA into host cells, with the aim of inducing the expression of specific antigens capable of triggering a preventive and therapeutic immune response. Among non-viral vectors, plasmid DNA (pDNA) has been the most widely explored due to its low cost and ease of production. However, the presence of bacterial elements, such as antibiotic resistance genes, can trigger undesired immune responses and compromise its safety.

As an alternative, minicircle DNA (mcDNA) represents a more advanced generation of vectors, generated through intramolecular recombination of the parental plasmid (PP) in bacterial cultures, which divides into two daughter molecules, the miniplasmid (mP) (containing only the prokaryotic genes required during the production process) and the mcDNA (composed exclusively of the eukaryotic expression cassette). This feature provides mcDNA with significant advantages over conventional pDNA, including greater safety, smaller size, enhanced transfection efficiency, higher intracellular stability, and prolonged gene expression, resulting in increased therapeutic potential. Nonetheless, its clinical application requires the development of robust production and purification methods capable of meeting the requirements of regulatory authorities.

In this context, the present work aimed to investigate hydrophobic interaction chromatography (HIC) as a strategy for the purification of pDNA and mcDNA. Initially, separation conditions between pDNA and RNA were assessed, followed by the evaluation of the selectivity between mcDNA and RNA. It was observed that mcDNA tends to elute at earlier stages, which may be related to its lower hydrophobicity compared to RNA.

The quantification assays made it possible to evaluate the purity and recovery of the DNA vectors according to the strategies explored, verifying their compliance with the parameters defined by regulatory agencies under the optimized conditions. However,

clear separation of DNA isoforms or between mcDNA and PP was not achieved. In summary, the results demonstrate that HIC is a promising approach for mcDNA purification, providing a solid foundation for future optimizations and for consolidating this vector as a next-generation therapeutic tool.

Keywords

Cervical cancer; HPV; Hydrophobic interaction chromatography; Minicircle DNA; Plasmid DNA.

Índice

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Cancro do colo do útero	1
1.2. Vírus do Papiloma Humano	2
1.2.1. Estrutura molecular do HPV	2
1.2.2. Ciclo de vida do HPV	4
1.2.3. Oncogenes virais	5
1.2.3.1. Oncoproteína E6	5
1.2.3.2. Oncoproteína E7	6
1.2.4. Vacinação preventiva e terapêutica	7
1.3. Terapias de DNA	9
1.3.1. Terapia génica	10
1.3.2. Vacinas de DNA	11
1.3.3. Entrega génica	12
1.3.3.1. Vetores virais	13
1.3.3.2. Vetores não virais	16
1.4. DNA plasmídico	17
1.4.1. Produção de DNA plasmídico	18
1.4.2. Purificação de DNA plasmídico	19
1.4.2.1. Cromatografia de afinidade	20
1.4.2.2. Cromatografia de troca iónica	20
1.4.2.3. Cromatografia de exclusão molecular	21
1.4.2.4. Cromatografia de interação hidrofóbica	21
1.5. DNA minicircular	23
1.5.1. Produção de DNA minicircular	24
1.5.2. Purificação de DNA minicircular	25
Capítulo 2 – Objetivos	27
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	29
3.1. Produção de pDNA e mcDNA	29

3.1.1. Condições de crescimento bacteriano e produção de pDNA	29
3.1.2. Produção de mcDNA	29
3.2. Lise alcalina modificada.....	30
3.3. Purificação de pDNA e mcDNA através de cromatografia de interação hidrofóbica	31
3.4. Quantificação de DNA.....	32
3.5. Eletroforese em gel de agarose.....	33
Capítulo 4 – Resultados e discussão	35
4.1. Biossíntese e extração do pDNA e mcDNA	35
4.2. Ensaio Cromatográfico.....	37
4.2.1. Coluna <i>Hexyl-650C</i>	37
4.2.1.1. Otimização das condições de seletividade	37
4.2.1.2. Capacidade de ligação.....	45
4.2.2. Coluna <i>Butyl-650M</i>	47
4.2.2.1. Otimização das condições de seletividade com amostras de lisado clarificado .	47
4.2.2.2. Etapa de captura na coluna <i>Hexyl-650C</i> e polimento na <i>Butyl-650M</i>	52
4.2.3. Coluna <i>Butyl-650S</i>	56
4.2.3.1. Otimização das condições de seletividade com amostras de lisado clarificado .	56
4.2.3.2. Etapa de captura na coluna <i>Hexyl-650C</i> e polimento na <i>Butyl-650S</i>	61
4.3. Purificação de mcDNA	64
Capítulo 5 - Conclusões e perspectivas futuras.....	67
Referências bibliográficas	69

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 2022..... 1
- Figura 2.** Estrutura do genoma do HPV. 3
- Figura 3.** Ensaios clínicos de terapia génica até 2023. 11
- Figura 4.** Etapas principais no processo de produção de pDNA..... 18
- Figura 5.** Representação esquemática da produção do vetor de DNA minicircular (mcDNA) a partir do plasmídeo parental (PP). 25

Capítulo 3 - Materiais e métodos

- Figura 6.** Curva de calibração com padrões de DNA (1 - 50 µg/mL). Cada ponto representa a média dos duplicados para cada padrão, incluindo os respetivos desvios padrão. 32

Capítulo 4 - Resultados e discussão

- Figura 7.** Curva de crescimento da *E. coli* transformada com o plasmídeo parental. ... 36
- Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose das amostras de lisados clarificados. A) Amostra de lisado clarificado de PP; B) Amostra de lisado clarificado de mcDNA. 37
- Figura 9.** A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de amostra de lisado de PP na coluna Hexyl-650C equilibrada com 2M de SA, utilizando um gradiente linear de 20min de 2M a 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose..... 38
- Figura 10.** A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 3M de SA, seguida de um gradiente linear de 20min de 2,2M a 1,2M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5, e posterior redução para 0M. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. 39
- Figura 11.** A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 3M de SA, seguida de gradientes por passos a 2M, 1,5M e 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose..... 40
- Figura 12.** A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 2M de SA, seguida de gradientes por passos a 1,35M e 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose..... 41
- Figura 13.** A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 2M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas,

passagem direta para oM de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	42
Figura 14. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 µL de lisado de PP na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 1,8M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para oM de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	43
Figura 15. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 2,1M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para oM de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	43
Figura 16. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 1,9M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para oM de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	44
Figura 17. A) Cromatograma obtido após injeção de 200µL de lisado de PP na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 2M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para oM de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	46
Figura 18. A) Cromatograma obtido após injeção de 500µL de lisado de PP na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 2M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para oM de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	46
Figura 19. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Butyl-650M, equilibrada com 3M de SA, seguida de um gradiente linear de 20min até 1M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5, e posterior redução para oM. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	48
Figura 20. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Butyl-650M, equilibrada com 2,1M de SA, seguida de um gradiente linear de 20min até 1M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5, e posterior redução para oM. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	49
Figura 21. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Butyl-650M, equilibrada com 1,9M de SA, passando depois para 1,5M, e, por fim, para oM de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	50
Figura 22. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Butyl-650M, equilibrada com 2M de SA, , e após lavagem das espécies não ligadas,	

passagem direta para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	51
Figura 23. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de amostra (previamente capturada na coluna Hexyl-650C) na coluna Butyl-650M, equilibrada com 3M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	53
Figura 24. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de amostra (capturada na coluna Hexyl-650C) na coluna Butyl-650M, equilibrada com 3M de SA, passando depois para 2,1M e realizando-se um gradiente linear de 30min até 1,5M, passando no final para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	54
Figura 25. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de amostra (capturada na coluna Hexyl-650C) na coluna Butyl-650M, equilibrada com 2,5M de SA e 0,5M de sulfato de sódio, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	55
Figura 26. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Butyl-650S, equilibrada com 2,4M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0,9M, passando no final para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	57
Figura 27. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Butyl-650S, equilibrada com 2,1M de SA, passando depois para 1,5M, e, por fim, para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	58
Figura 28. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Butyl-650S, equilibrada com 2,5M de SA, passando depois para 1,8M, e, por fim, para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	59
Figura 29. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Butyl-650S, equilibrada com 2,4M de SA, passando depois para 2M, e, por fim, para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	59
Figura 30. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna Butyl-650S, iniciando com uma concentração de 1,9M, passando diretamente para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	60

Figura 31. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de amostra (capturada na coluna Hexyl-650C) na coluna Butyl-650S, equilibrada com 3M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	61
Figura 32. A) Cromatograma obtido após injeção de 200µL de amostra (capturada na coluna Hexyl-650C) na coluna Butyl-650S, equilibrada com 2,1M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0,6M, passando depois para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.	62
Figura 33. A) Cromatograma obtido após injeção de 500µL de amostra (capturada na coluna Hexyl-650C) na coluna Butyl-650S, equilibrada com 3M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	63
Figura 34. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de amostra de lisado clarificado de mcDNA na coluna Hexyl-650C, equilibrada com 2M de SA, e realizando posteriormente um passo para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	64
Figura 35. A) Cromatograma obtido após injeção de 500µL de amostra (de mcDNA capturada na coluna Hexyl-650C) na coluna Butyl-650S, equilibrada com 3M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose.....	65

Lista de Tabelas

Capítulo 1 – Introdução

Tabela 1. Características das vacinas atualmente disponíveis	8
Tabela 2. Vantagens das vacinas de DNA comparativamente às vacinas tradicionais .	12
Tabela 3. Vantagens e desvantagens dos vários vetores virais utilizados em terapia génica.	15

Capítulo 4 - Resultados e discussão

Tabela 4. Comparação da pureza e da recuperação do DNA obtidos a diferentes concentrações iniciais de sulfato de amónio na coluna Hexyl-650C.	45
Tabela 5. Comparação da pureza e da recuperação do DNA obtidos a diferentes concentrações iniciais de sulfato de amónio na coluna Butyl-650M.	51
Tabela 6. Comparação da pureza e da recuperação do DNA obtidos após a etapa de polimento nas colunas Butyl-650M e Butyl-650S.....	64

Lista de Acrónimos

AC	Cromatografia de afinidade
AEC	Cromatografia de troca aniónica
CV	Volumes de coluna
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT1	DNA Metiltransferase 1
DO _{600nm}	Densidade ótica a 600nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E6AP	<i>E6-Associated protein</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
gDNA	DNA genómico
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
HPV	Vírus do Papiloma Humano
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LCR	Região Longa de Controlo
ln	Linear
M	Molar
m/v	Massa/volume
mAU	<i>Miliabsorbance unit</i>
mcDNA	DNA minicircular
mP	Mini-plasmídeo
oc	Circular aberta
OMS	Organização mundial de saúde
pDNA	DNA plasmídico
PP	Plasmídeo parental
pRB	Proteína do Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
SA	Sulfato de amónio
sc	Superenrolada
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
UV	Ultravioleta
VLPs	<i>Virus-Like Particles</i>

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Cancro do colo do útero

O cancro do colo do útero é um dos carcinomas mais prevalentes entre as mulheres a nível mundial, ocupando o quarto lugar em incidência após os cancros da mama, colorretal e do pulmão. A infeção persistente por subtipos de alto risco do Vírus do Papiloma Humano (HPV) constitui o principal fator etiológico desta neoplasia [1].

Adicionalmente, fatores comportamentais e ambientais, como múltiplos parceiros sexuais, uso de contraceptivos orais, tabagismo e condições de higiene inadequadas estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento deste carcinoma [2].

De acordo com o último relatório emitido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), publicado em 2022, estima-se que a prevalência global de infeções por HPV tenha resultado em aproximadamente 660.000 novos casos de cancro do colo do útero e 350.000 óbitos associados (Figura 1). Destes, cerca de 85% ocorreram em países de baixo e médio rendimento, onde a taxa de mortalidade associada ao cancro do colo do útero pode ser até 18 vezes superior à registada em países desenvolvidos. Este cenário reflete dificuldades no diagnóstico precoce, limitações na implementação de programas de rastreamento e restrições no acesso a tratamentos eficazes [2–4].

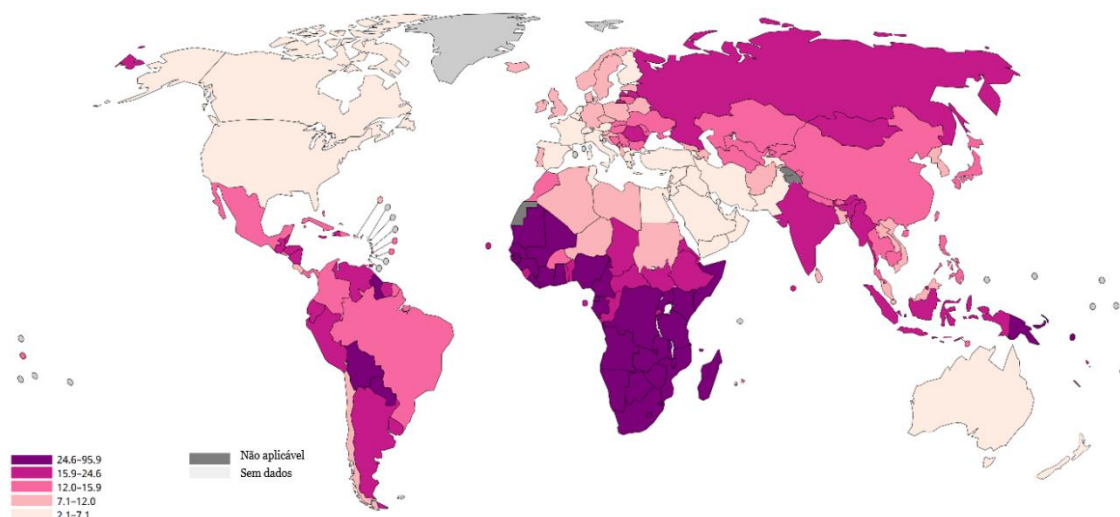


Figura 1. Estimativa da mortalidade mundial associada ao cancro do colo do útero, por cada 100.000 mulheres, no ano de 2022 (Adaptado de [4]).

1.2. Vírus do Papiloma Humano

O HPV é um vírus de DNA circular, pertencente à família *Papillomaviridae*, cuja estrutura viral é composta por uma cápside icosaédrica. Com base na organização genómica e no tropismo epitelial, os genótipos de HPV são agrupados em cinco géneros principais: *Alfa*, *Beta*, *Gama*, *Mu* e *Nu*. O género *Alfa* constitui o grupo mais relevante do ponto de vista oncológico, englobando os genótipos associados à oncogénese cervical [5].

Embora o HPV possa ser transmitido por vias não sexuais, a transmissão sexual é a principal forma de contágio, com maior prevalência em mulheres jovens, geralmente por volta dos 25 anos. Na maioria dos casos, a infeção é eliminada pelo sistema imunitário num período de 6 a 12 meses. Contudo, quando a infeção persiste, pode evoluir para neoplasias intraepiteliais cervicais, e, eventualmente, para carcinoma invasivo [5–7].

Existem mais de 200 subtipos de HPV identificados, classificados como de baixo ou alto risco, dependendo do seu potencial oncogénico [3]. Enquanto os tipos de baixo risco têm um potencial reduzido de transformação maligna, os tipos de alto risco, como o HPV-16 e HPV-18, são os principais promotores da transformação neoplásica e estão implicados em aproximadamente 70% dos casos de cancro do colo do útero [2,3,6]. O HPV-16 é o genótipo mais prevalente, estando implicado em cerca de 55-60% dos casos, enquanto o HPV-18 está associado a 20% dos adenocarcinomas cervicais. Outros genótipos de alto risco (26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82), são também classificados como carcinogénicos e contribuem para cerca de 25% dos restantes casos de carcinoma cervical [2,5].

A deteção precoce destas infeções é dificultada pelo facto de, na maioria das vezes, se apresentarem de forma assintomática nas fases iniciais, tornando essenciais programas de rastreamento regular [6]. Além do cancro do colo do útero, o papel oncogénico do HPV está bem estabelecido em outros tipos de neoplasias, incluindo cancro da vulva, vagina, pénis, orofaringe, ânus e reto [1].

1.2.1. Estrutura molecular do HPV

Os mecanismos pelos quais o HPV induz a formação de tumores no colo do útero estão diretamente relacionados com a estrutura do seu genoma. Este é constituído por uma molécula de DNA circular de dupla hélice, com um comprimento entre 6,8 e 8 kb, organizada em três regiões distintas: a região inicial (E), a região tardia (L) e a Região Longa de Controlo (LCR) (Figura 2). Cada uma destas regiões desempenha funções

específicas e essenciais para o ciclo de vida do vírus e a sua capacidade de infecção e transformação celular [1,5,8].

A região E inclui os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, fundamentais nas etapas iniciais da infecção viral. Os genes E1, E2 e E4 estão envolvidos na replicação do DNA viral, sendo que E2 também regula negativamente a expressão de E6 e E7. O gene E5 promove a proliferação das células infetadas, enquanto E6 e E7 interferem com proteínas reguladoras do ciclo celular, favorecendo a transformação maligna das células hospedeiras [1,5,8].

A região L representa cerca de 40% do genoma do HPV e inclui os genes L1 e L2, responsáveis pela codificação das proteínas da cápside viral. Estas proteínas são essenciais para a proteção do material genético do vírus, bem como para a formação e disseminação de novas partículas virais [5,8].

Por fim, a LCR, também designada de região reguladora a montante (UPR), corresponde a cerca de 10% do genoma do HPV e não codifica proteínas. No entanto, desempenha um papel essencial no controlo da transcrição dos genes virais, pois contém o ponto de origem da replicação, e locais de ligação para fatores de transcrição que regulam a atividade do genoma viral [5,8].

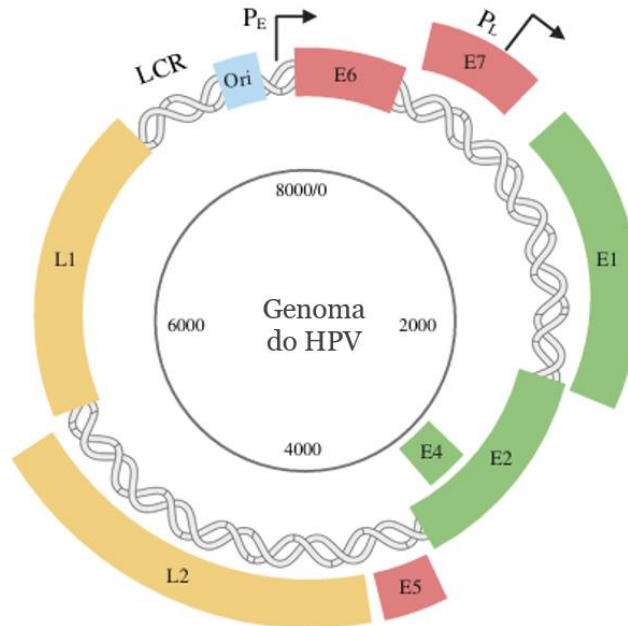


Figura 2. Estrutura do genoma do HPV (Adaptado de [9]).

1.2.2. Ciclo de vida do HPV

A infecção pelo HPV inicia-se quando o vírus penetra o epitélio do colo do útero através de microlesões, geralmente provocadas por traumas, que expõem as células basais. Estas células, localizadas nas camadas mais profundas do epitélio, atuam como células estaminais, e são responsáveis pela sua renovação contínua, constituindo o principal alvo do HPV [9,10].

Após a entrada na célula hospedeira, o genoma viral migra até ao núcleo, onde permanece sob a forma epissomal, iniciando uma fase de replicação inicial do seu DNA. Esta replicação é mediada pelas proteínas virais E1 e E2, que asseguram a manutenção e segregação do genoma viral durante a divisão celular [9,11]. E1 e E2 são as únicas proteínas codificadas pelo vírus necessárias para a replicação do DNA, sendo as restantes proteínas envolvidas provenientes da maquinaria de replicação da célula hospedeira [11].

À medida que as células infetadas se dividem e migram para camadas mais superficiais do epitélio, iniciam a sua diferenciação. Com isto, o vírus ativa os genes necessários à produção das proteínas virais, o que possibilita a progressão de uma infecção latente para uma infecção ativa/persistente [12,13]. Nesta fase, as proteínas E5, E6 e E7 desempenham um papel central, ao estimular a proliferação celular e a evasão da apoptose, favorecendo a replicação viral e perturbando os mecanismos de controlo do ciclo celular [14,15]. Em infecções persistentes por tipos de alto risco, o DNA viral pode integrar-se no genoma da célula hospedeira, frequentemente interrompendo o gene E2. Esta desregulação leva à expressão contínua dos oncogenes E6 e E7, cuja atividade prolongada promove a imortalização celular e pode induzir alterações displásicas que, se não revertidas, evoluem para carcinoma invasivo [12,14,15]

Nas camadas epiteliais superiores, ocorre a fase replicativa da infecção, caracterizada por uma intensa amplificação do DNA viral e pela expressão dos genes tardios L1 e L2, responsáveis pela formação da cápside viral. A produção de novos viriões culmina com a sua libertação através do processo natural de descamação celular, assegurando a disseminação do vírus [11,14,16].

O HPV evita eficazmente a deteção pelo sistema imunitário, uma vez que a produção de novos viriões ocorre em zonas com baixa vigilância imunitária, e a expressão viral é mantida em níveis reduzidos na camada basal, dificultando a deteção pelo sistema imune. Adicionalmente, as proteínas E6 e E7 contribuem para a inibição de respostas antivirais do hospedeiro, favorecendo a persistência da infecção [10,14].

1.2.3. Oncogenes virais

As oncoproteínas E6 e E7 do HPV são essenciais para a manutenção do fenótipo transformado das células infetadas, sendo continuamente expressas em tumores e em linhas celulares derivadas. E6 interfere com vias de sobrevivência celular, enquanto E7 promove a proliferação celular. No entanto, nenhuma das duas é suficiente para induzir a imortalização de forma isolada [12].

Além disso, E6 e E7 promovem diversas características típicas das células cancerígenas, incluindo proliferação desregulada, evasão da apoptose, ativação da telomerase, angiogénese e potencial metastático. O papel mais crítico destas proteínas reside na degradação da p53 por E6 e na inibição da proteína do retinoblastoma (pRb) por E7, eventos centrais no processo de transformação celular [17,18].

1.2.3.1. Oncoproteína E6

A proteína supressora de tumor p53 é essencial na resposta a danos genéticos, ativando mecanismos de reparação ou induzindo apoptose quando os danos são irreparáveis, prevenindo assim o desenvolvimento de cancro [8,14].

A *E6-associated protein* (E6AP), codificada pelo gene UBE3A, é uma ligase de ubiquitina E3 cuja desregulação está associada a várias patologias. No contexto da infeção pelo HPV, é sequestrada pela oncoproteína E6, que a utiliza para ubiquitinar proteínas celulares e direcioná-las para degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Um dos principais alvos deste processo é a p53. Em associação com a E6AP, a E6 promove a sua degradação proteolítica, reduzindo significativamente os seus níveis. A perda de função da p53 compromete a resposta celular a danos genéticos, inibe a apoptose e favorece a proliferação celular descontrolada [12,13].

Além da p53, E6 também degrada outras proteínas pró-apoptóticas, como Bak, Bax, e FADD, e ativa o fator de transcrição NF- κ B, promovendo a expressão de genes antiapoptóticos. Adicionalmente, E6 suprime coativadores transcripcionais como p300/CBP, fundamentais para o controlo do ciclo celular, contribuindo para a desregulação da proliferação [5,19].

A proteína E6 induz ainda invasão celular e metastização através da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), que causam danos ao DNA e reduzem os níveis de enzimas

antioxidantes. Também degrada proteínas com domínios PDZ, como SCRIB e as MAGUKs (*membrane-associated guanylate kinases*), comprometendo a polaridade e diferenciação celular [5].

Por fim, E6 promove a imortalização celular ao induzir alterações epigenéticas na hTERT (telomerase) através da sobre-expressão de c-Myc e Sp1, recrutando a RNA polimerase II fosforilada e contribuindo para a ativação sustentada da transcrição [5].

1.2.3.2. Oncoproteína E7

A proteína supressora tumoral pRb desempenha um papel central na regulação da progressão do ciclo celular, bloqueando a transição da fase G₁ para a fase S. Este controlo é exercido através da sua interação com fatores de transcrição da família E2F, cuja inibição impede a transcrição de genes necessários à síntese de DNA. A fosforilação da pRb por complexos ciclina D–CDK promove a sua dissociação do E2F, permitindo o avanço do ciclo celular [8,14,19].

Na presença de danos no DNA, a ativação da p53 induz a expressão da p21, um inibidor de CDKs, que impede a fosforilação da pRb, mantendo-a funcional e interrompendo a progressão celular. No entanto, a oncoproteína E7 interfere neste controlo ao ligar-se diretamente à forma hipofosforilada (ativa) da pRb, promovendo a sua degradação mediada pela via ubiquitina-proteassoma. Esta degradação liberta E2F de forma constitutiva, favorecendo a entrada prematura das células na fase S e a proliferação desregulada [8,14]. Além da pRb, E7 também degrada as proteínas p107 e p130, que inibem a E2F4 e E2F5, respetivamente, ampliando o estímulo à proliferação celular [5,12].

A nível epigenético, E7 modula a atividade da DNA metiltransferase 1 (DNMT1), induzindo a hipermetilação de sequências CpG e o conseqüente silenciamento de genes supressores tumorais. Este mecanismo é facilitado pela libertação de E2F, que também se associa à DNMT1 [13,14].

Além disso, a E7 interfere nos mecanismos de resposta ao dano no DNA ao induzir a sobreexpressão da proteína Claspinga, um regulador do checkpoint do ciclo celular. Isto permite que as células continuem a proliferar mesmo na presença de danos no DNA, comprometendo a integridade genómica [5].

Em síntese, as oncoproteínas E6 e E7 do HPV desempenham um papel central na desregulação do ciclo celular, na inibição da apoptose e na indução de alterações genéticas e epigenéticas que favorecem a transformação neoplásica [18,19]. Perante a persistência da infecção por HPV, torna-se essencial adotar estratégias de rastreio e prevenção, capazes de detetar precocemente lesões pré-neoplásicas e reduzir o risco de progressão para carcinoma cervical. Neste cenário, as vacinas preventivas surgem como ferramentas cruciais para impedir a infecção inicial, enquanto as vacinas terapêuticas representam uma abordagem promissora para o tratamento de infecções já estabelecidas e de lesões associadas, ao estimular respostas imunitárias celulares específicas e promover a eliminação de células alteradas [20,21].

1.2.4. Vacinação preventiva e terapêutica

A estratégia de controlo do cancro do colo do útero recomendada pela OMS baseia-se em três pilares fundamentais: rastreio e tratamento de lesões pré-cancerosas, vacinação contra o HPV e diagnóstico e tratamento do cancro invasivo [8,20]. A vigilância regular através de testes de deteção de HPV de alto risco e exames citológicos (Papanicolau) tem sido fundamental na redução da incidência e mortalidade do cancro do colo do útero, ao permitir a deteção precoce do vírus e de lesões pré-neoplásicas, facilitando intervenções eficazes em fases iniciais [6,20].

Apesar da importância do rastreio, a vacinação profilática contra o HPV é atualmente considerada a medida preventiva mais eficaz [21]. Estas vacinas têm como alvo a proteína L1 da cápside viral, que, quando organizada em partículas semelhantes ao vírus (*virus-like particles*, VLPs), desencadeia uma resposta imunitária humoral, promovendo a produção de anticorpos neutralizantes específicos para cada tipo de HPV [22–24]. Estes anticorpos impedem a entrada do vírus nas células epiteliais basais do colo do útero, constituindo o principal mecanismo de proteção conferido pela vacina. As VLPs são estruturas recombinantes, não infecciosas e não oncogénicas, mas com propriedades antigénicas semelhantes às do vírus, estando na base de todas as vacinas comerciais atualmente disponíveis [24,25]. No entanto, estas vacinas não têm efeito terapêutico, ou seja, não permitem a eliminação de infecções já estabelecidas nem no tratamento de lesões causadas pelo HPV [21,23,25].

Atualmente, encontram-se licenciadas seis vacinas profiláticas contra o HPV: três bivalentes, duas quadrivalentes e uma nonavalente [22]. A Gardasil, aprovada em 2006, oferece proteção contra os tipos HPV-6, 11, 16 e 18. Em 2007, surgiu a Cervarix, bivalente

e focada nos tipos oncogénicos 16 e 18. Em 2014, a Gardasil 9 ampliou a proteção para nove tipos, incluindo HPV-31, 33, 45, 52 e 58. Recentemente, as vacinas bivalentes Cocolin e Walrinvax, direcionadas contra os tipos 16 e 18, foram pré-qualificadas pela OMS, e a quadrivalente Cervavac foi lançada na Índia [24]. A Tabela 1 resume as principais características das vacinas disponíveis.

Tabela 1. Características das vacinas atualmente disponíveis (Adaptado de [21]).

	Gardasil	Cevarix	Gardasil 9	Cocolin	Walrinvax	Cervavac
Fabricante	Merck &Co. 2006	GlaxoSmithKline 2007	Merck &Co. 2014	Xiamen Innovax Biotechnology 2020	Walvax 2022	Serum Institute of India 2022
País de origem	Austrália e EUA	Austrália e EUA	EUA	China	China	Índia
Faixa etária alvo	9–26 anos	9–25 anos	9–45 anos	9–45 anos	9–30 anos	9–26 anos
Tipo	Quadrivalente	Bivalente	Nonavalente	Bivalente	Bivalente	Quadrivalente
Proteção contra	HPV-6, 11, 16, e 18	HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, e 58	HPV-16 e 18	HPV-16 e 18	HPV-16 e 18	HPV-6, 11, 16, e 18
Dosagem	2–3 doses (0, 2, 6 meses)	2 doses (0, 5–13 meses)	2 doses (0, 6–12 meses)	3 doses (0, 1, 6 meses)	3 doses (0, 1, 6 meses)	2 doses (0, 6– 12 meses)

Apesar da eficácia das vacinas profiláticas, a infecção por HPV de alto risco continua elevada, principalmente devido à baixa cobertura vacinal e à existência de infecções prévias [24]. O tratamento do cancro do colo do útero assenta, sobretudo, na cirurgia, quimioterapia e radioterapia, conforme a progressão da doença. No entanto, em casos avançados, com recorrência ou metástases, o prognóstico mantém-se desfavorável, evidenciando a necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes e menos invasivas [6,11].

As vacinas terapêuticas em estudo emergem como uma abordagem promissora, apresentando maior eficácia quando administradas em lesões pré-neoplásicas, fase na qual a imunossupressão induzida pelo tumor ainda é reduzida [21]. As vacinas terapêuticas são desenvolvidas para tratar infecções pelo HPV e doenças associadas, estimulando a imunidade celular. Esta estratégia ativa linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e T CD4⁺ auxiliares, que reconhecem e eliminam células infectadas pelo HPV [23]. As proteínas da cápside L1 e L2 não são expressas nas células basais que albergam a infecção em tecidos pré-cancerosos ou cancerosos, o que sugere que não são bons alvos para vacinas terapêuticas [25]. Por outro lado, as oncoproteínas E6 e E7 do HPV são consideradas alvos promissores, uma vez que são as únicas proteínas virais que são expressas de forma contínua em malignidades associadas ao HPV, pois desempenham um papel essencial na desregulação do ciclo celular e na progressão tumoral [23,25]. A sua utilização em vacinas terapêuticas visa estimular uma resposta imunitária específica, capaz de ativar mecanismos celulares direcionados à eliminação seletiva das células infectadas ou cancerígenas [18,21,23].

As abordagens para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas incluem vetores vivos, vacinas baseadas em péptidos e proteínas, vacinas de ácidos nucleicos e vacinas de células inteiras, cada uma com vantagens e limitações específicas. Apesar dos resultados promissores em ensaios clínicos, ainda não há uma vacina terapêutica licenciada contra o HPV, o que evidencia os desafios na tradução destas estratégias inovadoras em terapias clínicas eficazes [23,25].

1.3. Terapias de DNA

Desde as descobertas iniciais de Gregor Mendel até ao sequenciamento do genoma humano, a genética registou avanços que transformaram o diagnóstico e o tratamento de numerosas patologias, especialmente das doenças genéticas antes consideradas incuráveis. Nas últimas décadas, as terapias baseadas em tecnologia de DNA recombinante evoluiu significativamente, impulsionada pelo crescente interesse na terapia de DNA como estratégia para tratar diversas doenças humanas, incluindo o atraso da progressão tumoral e o combate a infecções virais. A compreensão aprofundada dos mecanismos moleculares e patológicos, juntamente com o aperfeiçoamento das técnicas de manipulação de DNA, abriu caminho para o desenvolvimento de abordagens inovadoras, como a terapia génica e as vacinas de DNA, com elevado potencial preventivo e terapêutico [26,27].

1.3.1. Terapia génica

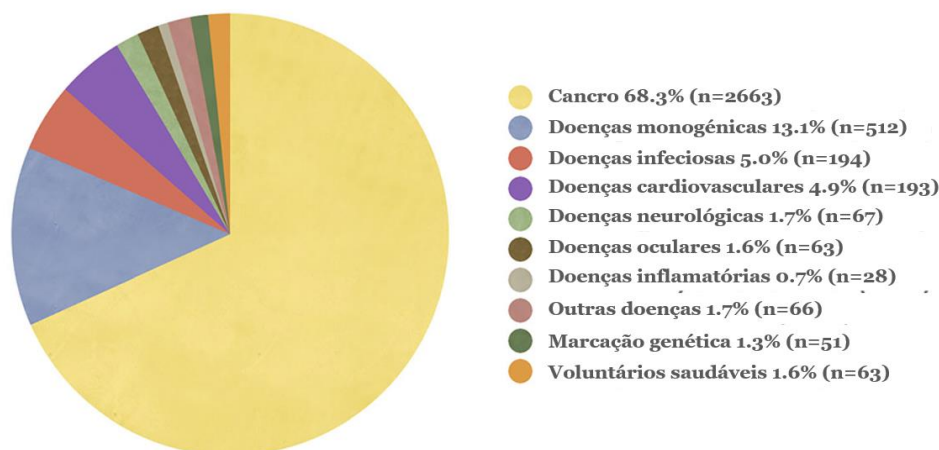
A terapia génica consiste na utilização de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) para o tratamento de doenças humanas. Esta abordagem baseia-se na introdução de genes funcionais que substituam versões defeituosas ou ausentes, ou na inibição de genes prejudiciais, utilizando diversas tecnologias, como oligonucleótidos livres, vetores virais e não virais [28–30].

Inicialmente concebida para o tratamento de doenças monogénicas, causadas por mutações em um único gene, a terapia génica tem vindo a expandir-se e é atualmente aplicada em doenças complexas, crónicas e progressivas, incluindo cancro, insuficiência cardíaca, doenças neurodegenerativas e metabólicas. Nestes casos, as estratégias terapêuticas podem incluir a modulação da resposta imunitária, indução seletiva da apoptose, regulação de funções celulares ou produção de proteínas terapêuticas específicas, mesmo quando os genes alvo não estão diretamente relacionados à etiologia da doença [26,28,29].

Do ponto de vista metodológico, a terapia génica divide-se em duas abordagens principais: a terapia “*ex vivo*”, em que células do paciente são isoladas, geneticamente modificadas e reintroduzidas, e a terapia “*in vivo*”, em que o material genético é transferido diretamente para o tecido-alvo, geralmente por meio de vetores [29]. O sucesso desta terapia depende da capacidade do material genético ultrapassar barreiras celulares, ser corretamente expresso de forma regulada e sustentada, sem causar toxicidade, interferência no genoma hospedeiro ou transformação carcinogénica, e assegurando ainda que as células modificadas sobrevivam e mantenham a alteração [29,31].

A terapia génica pode ainda ser classificada em germinativa ou somática. A terapia germinativa, que altera células reprodutivas e pode transmitir mudanças hereditárias, levanta importantes questões éticas, não sendo utilizada clinicamente. Em contraste, a terapia somática, que não afeta a descendência, é a abordagem mais explorada e empregue em ensaios clínicos, sendo a escolha das células-alvo dependente da patologia a tratar [27].

O cancro continua a ser a principal área de investigação dos ensaios clínicos de terapia génica (68.3%), seguido das doenças monogénicas (13.1%), doenças infecciosas (5%) e doenças cardiovasculares (4.9%) (Figura 3) [30].



Updated March 2023 - Copyright © 2024 by John Wileys and Sons LTD

Figura 3. Ensaio clínico de terapia génica até 2023 (adaptado de [30]).

Dada a capacidade da terapia génica de modular a expressão de genes e induzir respostas celulares específicas, os princípios desta abordagem têm sido aplicados no desenvolvimento de vacinas de DNA, que visam estimular tanto a imunidade humoral quanto a celular, oferecendo uma estratégia inovadora na prevenção e no tratamento de doenças infecciosas e oncológicas [32,33].

1.3.2. Vacinas de DNA

A vacinação é uma das aplicações mais bem-sucedidas da imunologia, tendo desempenhado um papel crucial na erradicação e no controlo de diversas doenças infecciosas [32,33]. Desde a introdução da inoculação contra a varíola no século XVIII, foram desenvolvidos diferentes tipos de vacinas, incluindo vivas atenuadas, inativadas, de subunidades ou componentes, recombinantes e toxoides. Apesar da sua eficácia, as vacinas vivas atenuadas podem provocar reações adversas relacionadas com o próprio fenótipo atenuado, enquanto as vacinas inativadas ou de subunidades, embora induzam a produção de anticorpos neutralizantes, podem ser insuficientes para estimular respostas imunitárias celulares robustas, essenciais para o controlo de patógenos intracelulares [33].

Neste contexto, as vacinas de DNA surgem como uma alternativa promissora às formulações convencionais, uma vez que conseguem induzir respostas celulares robustas, além da resposta humoral [33].

Estas vacinas baseiam-se na introdução de um vetor de DNA (transfecção), nas células do hospedeiro. Os vetores de DNA mais explorados são os plasmídeos, geralmente derivados de *Escherichia coli*, que contêm genes procariotas (importantes para a etapa de produção do plasmídeo) e genes eucariotas (fundamentais para a expressão dos antígenos no paciente). O seu mecanismo de ação ocorre em três etapas: captação do plasmídeo por células do hospedeiro, como miócitos ou células apresentadoras de antígenos (APCs), produção e processamento do antígeno no núcleo, após transcrição e tradução, e apresentação antigénica via moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), I e II, ativando linfócitos T CD8⁺ (resposta citotóxica) e T CD4⁺, bem como linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos e memória imunitária [34–36].

Comparativamente às vacinas convencionais, as vacinas de DNA apresentam diversas vantagens, incluindo maior estabilidade e facilidade de produção, ausência de agentes infecciosos vivos e a capacidade de induzir uma gama mais ampla de respostas imunitárias [35]. Um resumo das principais vantagens destas vacinas encontra-se apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Vantagens das vacinas de DNA comparativamente às vacinas tradicionais (Adaptado de [35]).

Vantagens das vacinas de DNA
Baixo custo de produção
Persistência prolongada da imunogenicidade
Ausência de risco de infeção
Facilidade de desenvolvimento e produção
Resposta imunitária direcionada ao antígeno de interesse
Estabilidade para armazenamento e transporte
Segurança e facilidade de manuseio
Estabilidade térmica

1.3.3. Entrega génica

A terapia génica e as vacinas de DNA baseiam-se na introdução de material genético nas células-alvo, um processo que enfrenta múltiplas barreiras biológicas. A entrada espontânea de DNA puro nas células eucarióticas é extremamente rara, sendo necessário

recorrer a sistemas de entrega, isto é, sistemas concebidos para transportar, proteger e direcionar o material genético até ao núcleo celular, assegurando a sua correta expressão [26,27].

Durante a entrega génica, o material genético enfrenta obstáculos extracelulares, como a degradação por nucleases, a interação com proteínas séricas, a repulsão eletrostática entre o DNA e a membrana celular, e a eliminação pelo sistema imunitário. Após a internalização, existem ainda barreiras intracelulares, incluindo o escape endossomal, o transporte no citoplasma e a passagem restrita através dos poros nucleares. Além disso, é fundamental que o material genético permaneça estável no interior da célula hospedeira [37,38]. Desta forma, um vetor ideal deve ser capaz de superar todas estas barreiras, além de apresentar seletividade pelos tecidos alvo, ser seguro, fácil de produzir e purificar em larga escala, bem como ser viável economicamente [27,29].

Os sistemas de entrega podem ser classificados em vetores virais e não virais. Os vetores virais tiram partido da maquinaria natural dos vírus para introduzir genes nas células, mas podem desencadear respostas imunitárias e apresentar riscos associados à segurança. Por outro lado, os vetores não virais, embora mais seguros e fáceis de produzir, tendem a ter menor eficiência na transfeção e geralmente promovem uma expressão genética transitória [27,29,39]. Até à data, nenhum sistema conseguiu combinar simultaneamente elevada segurança, alta eficiência de transfeção e expressão genética estável e prolongada [29].

1.3.3.1. Vetores virais

A maioria dos produtos de terapia génica atualmente aprovados ou em desenvolvimento utiliza vetores virais para a entrega do material genético [29]. Estes vetores exploram a capacidade natural dos vírus para infetar células humanas, facilitando a internalização do transgene e recorrendo aos mecanismos celulares para a sua expressão [29,38,39]. Esta aptidão, associada à proteção conferida pela cápside viral contra a degradação lisossómica, torna-os veículos particularmente eficazes [38].

Para aplicações terapêuticas, os vírus são geneticamente modificados, eliminando os genes responsáveis pela replicação e substituindo-os pelo gene de interesse. Assim, obtêm-se partículas virais não replicativas, mas ainda capazes de infetar células e transferir o transgene [38,39]. Além disso, estes vetores podem ser adaptados para aumentar a especificidade celular, por exemplo, através da inserção de modificações que

direcionem a infecção a células com recetores específicos, ou pela incorporação de sequências reguladoras que permitam a expressão génica condicionada a estímulos moleculares. Alterações na cápside viral também são utilizadas para reduzir a imunogenicidade e evitar o reconhecimento pelo sistema imunitário [39].

Os principais vírus utilizados como vetores incluem adenovírus, vírus adeno-associados, vírus herpes simplex, retrovírus e lentivírus. Adenovírus são amplamente utilizados pela elevada eficiência de transfeção, embora induzam respostas imunitárias fortes. Vírus adeno-associados destacam-se pela baixa imunogenicidade e expressão sustentada, mas têm uma capacidade limitada de inserção. Retrovírus e lentivírus permitem integração estável no genoma, favorecendo expressão prolongada, enquanto o vírus herpes simplex oferece grande capacidade de inserção genética. Entre estes, adenovírus e vírus adeno-associados são os mais utilizados devido ao equilíbrio entre eficiência e segurança. [30,39]. As principais características, vantagens e limitações destes vetores encontram-se sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Vantagens e desvantagens dos vários vetores virais utilizados em terapia génica (Adaptado de [39]).

Vetor	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	Elevada eficiência de transfeção Infeta células proliferativas e não-proliferativas	Expressão transitória Toxicidade imunológica associada à administração repetida Ausência de especificidade celular Tamanho de inserção limitado: 4-5 kb
Retrovírus	Elevada eficiência de transfeção Tropismo celular amplo Expressão estável e prolongada Maior capacidade de inserção genética: 9-12 kb Baixa imunogenicidade	Transdução ineficiente Problemas de biosegurança: possibilidade de mutagénese insercional Apenas infeta células proliferativas Difícil de produzir
Vírus adeno-associados	Expressão prolongada Infeta vários tipos de células Baixa imunogenicidade	Pouco caracterizado Sem capacidade de direcionamento celular Potencial para mutagénese insercional Produção difícil Tamanho de inserção limitado
Lentivírus	Infeta células proliferativas e não-proliferativas Infeta células estaminais hematopoiéticas Proporciona uma expressão prolongada do transgene	Dificuldade na produção e armazenamento Tamanho limitado de inserção Experiência clínica ainda limitada
Vírus Herpes Simplex	Grande capacidade de inserção Tropismo neuronal	Citotóxico Sem especificidade de direcionamento celular Expressão transitória

Devido à sua elevada capacidade de invasão celular, os vetores virais apresentam, em geral, maior eficácia na transfeção génica. Contudo, a sua aplicação clínica levanta preocupações significativas, uma vez que estes vetores podem desencadear respostas imunogénicas indesejadas e provocar eventos de mutagénese resultantes da inserção do transgene no genoma do hospedeiro [37,40]. Além disso, apresentam limitações como a

reduzida capacidade de transporte de material genético, dificuldade na entrega de genes de grandes dimensões, complexidade nos processos de produção e a impossibilidade de serem administrados repetidamente no mesmo paciente. Face a estas limitações, os vetores não virais têm emergido como uma abordagem promissora no campo da terapia génica, atraindo um interesse crescente por parte da comunidade científica [37].

1.3.3.2. Vetores não virais

Os vetores não virais reúnem um conjunto de vantagens face aos vetores virais, nomeadamente baixa imunogenicidade, elevada biocompatibilidade, segurança, estabilidade e flexibilidade na modulação química [37,40]. Adicionalmente, constituem alternativas mais facilmente escaláveis para produção industrial, com processos de fabrico de menor complexidade. Ao contrário dos vetores virais, os vetores não virais não apresentam limitações significativas relativamente ao tamanho da sequência genética a ser introduzida. A entrega do material genético através destes sistemas pode ser realizada recorrendo a métodos físicos ou químicos [39,40].

Os métodos físicos baseiam-se na aplicação controlada de estímulos externos que induzem alterações transitórias nas membranas celulares, como microlesões ou perturbações estruturais, facilitando a entrada do material genético (DNA *naked*) por difusão [41]. Estas técnicas incluem a injeção direta de DNA, biobalística, eletroporação, sonoporação e hidroporação [38,42].

Por sua vez, os métodos químicos utilizam compostos sintéticos ou naturais que interagem com os ácidos nucleicos, formando complexos capazes de proteger, compactar e transportar o material genético até ao interior celular. Esta interação ocorre principalmente através de ligações eletrostáticas entre os grupos carregados negativamente do DNA ou RNA e as cargas positivas dos vetores [38]. Após a formação destes complexos, a sua internalização nas células alvo ocorre por processos como endocitose, macropinocitose ou fagocitose, originando vesículas intracelulares. Uma pequena fração do material genético é libertada dessas vesículas intracelulares para o citoplasma e subseqüentemente transportada para o núcleo, onde ocorre a expressão do transgene [38,41].

Os principais tipos de vetores químicos não virais são baseados em lípidos catiónicos ou em polímeros catiónicos. Os lípidos catiónicos destacam-se pela sua biodegradabilidade,

baixa citotoxicidade, diversidade estrutural e facilidade de produção. Apesar de apresentarem baixa imunogenicidade e reduzida toxicidade, estes vetores continuam a apresentar limitações associadas à sua reduzida eficiência de transfeção, o que representa um dos principais entraves à sua aplicação clínica [38,40].

Entre os diversos sistemas não virais disponíveis, o DNA plasmídico (pDNA) destaca-se como um dos vetores mais amplamente estudados e utilizados em contextos de terapia génica e vacinação de DNA. Trata-se de uma molécula que combina simplicidade estrutural, facilidade de manipulação genética e baixo custo de produção, apresentando ainda a capacidade de promover expressão transiente e controlada do gene de interesse, sem risco de integração no genoma do hospedeiro [43].

1.4. DNA plasmídico

As vacinas de DNA e a terapia génica têm impulsionado o interesse crescente no uso de pDNA como ferramenta terapêutica. Os plasmídeos são pequenas moléculas circulares de DNA de cadeia dupla e capacidade autorreplicativa, que se destacam como vetores promissores devido à sua segurança, facilidade de manipulação e produção em larga escala, comparativamente aos vetores virais utilizados tradicionalmente [43,44]. Estes elementos genéticos podem conter genes que conferem vantagens à sobrevivência celular, como genes de resistência a antibióticos ou responsáveis pela síntese de proteínas específicas [43].

Para além da quantidade produzida, a conformação estrutural do pDNA é crucial para a eficácia terapêutica. O pDNA pode assumir diferentes formas estruturais, incluindo a isoforma circular aberta (oc), caracterizada por uma estrutura circular, a isoforma linear (ln), resultado do corte da molécula dupla com extremidades livres, e, principalmente, a isoforma superenrolada (sc), a conformação mais desejável para aplicações terapêuticas por não apresentar qualquer dano/corte na cadeia de DNA. Esta forma compacta assegura maior estabilidade, proteção contra degradação e capacidade aprimorada para induzir respostas imunitárias, sendo essencial em estratégias como vacinação por DNA e introdução de genes terapêuticos em células-alvo [43,45].

Contudo, o pDNA sc é sensível a condições físicas e químicas que podem induzir a sua conversão em formas menos estáveis, como a oc ou ln, comprometendo o rendimento e a eficácia dos processos de purificação e, consequentemente, o sucesso clínico das

terapias. Desta forma, o desenvolvimento de vacinas de DNA e terapias génicas depende não apenas da produção em larga escala do pDNA, mas também do rigoroso controlo da sua conformação e pureza, assegurando a preservação da isoforma sc ao longo de todo o processo produtivo [43].

1.4.1. Produção de DNA plasmídico

A produção de pDNA inicia-se com a construção e seleção de vetores de expressão mais adequados, assim como as células hospedeiras mais adequadas (neste caso as estirpes microbianas produtoras), seguida da otimização das condições de fermentação (processos *upstream*), o crescimento celular e, por fim, as etapas de isolamento e purificação (processos *downstream*), de forma a garantir elevados rendimentos e a estabilidade da molécula (Figura 4). Além de assegurar o rendimento e a qualidade do pDNA, estas decisões iniciais devem também considerar os requisitos de segurança e eficácia exigidos para vetores terapêuticos, bem como a viabilidade de produção em grande escala [44].

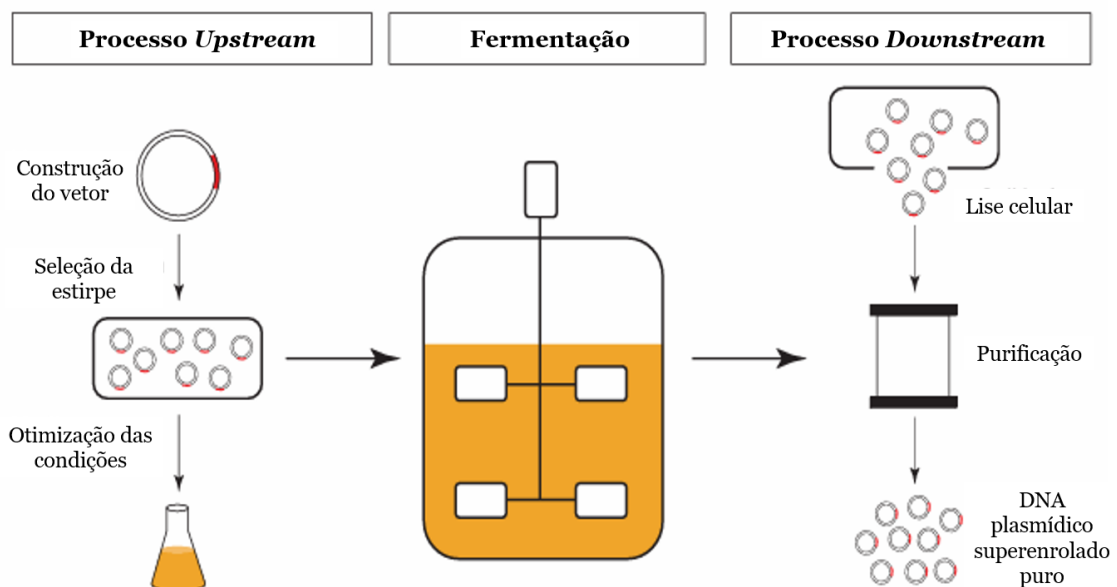


Figura 4. Etapas principais no processo de produção de pDNA (Adaptado de [44]).

Os plasmídeos são produzidos através da replicação autónoma em *E. coli*, uma bactéria amplamente utilizada na indústria biotecnológica devido ao seu histórico de segurança na produção de proteínas recombinantes, produtividade e baixo custo de produção

[45,46]. Após a biossíntese, a recuperação do pDNA envolve um conjunto de etapas que se inicia com a lise celular, sendo a lise alcalina o método preferencial a nível industrial pela sua eficácia e conformidade com as exigências regulamentares [45,47]. Esta técnica gera um lisado complexo, no qual o pDNA representa apenas uma pequena fração (cerca de 3%), enquanto a restante amostra é maioritariamente constituída por outras biomoléculas consideradas impurezas, tais como RNA, DNA genómico (gDNA), endotoxinas, proteínas e isoformas estruturais indesejadas, como o pDNA oc. Assim, dada a complexidade desta amostra, é fundamental aplicar estratégias de purificação eficazes que permitam obter o sc pDNA com uma elevada pureza [46].

1.4.2. Purificação de DNA plasmídico

A produção de pDNA para fins terapêuticos requer processos de purificação altamente eficientes, capazes de garantir elevados padrões de pureza, rendimento e integridade estrutural. De acordo com as diretrizes regulatórias, o pDNA terapêutico deve apresentar uma proporção mínima de 90% da isoforma sc, pureza global $\geq 97\%$ e níveis residuais de gDNA, RNA, proteínas e endotoxinas inferiores a 1% [43–46]. A presença destas impurezas compromete a segurança e a eficácia clínica, podendo induzir respostas imunológicas indesejadas e reduzir a atividade biológica do pDNA [44,46].

A cromatografia líquida constitui a técnica de eleição para purificação em larga escala, pela sua elevada resolução e seletividade. O processo explora propriedades intrínsecas do pDNA, como carga, hidrofobicidade, tamanho molecular e acessibilidade às bases nitrogenadas no caso da isoforma sc, permitindo separá-la das outras biomoléculas [44,46]. As principais modalidades empregues incluem troca aniónica (AEC), interação hidrofóbica (HIC), exclusão molecular (SEC) e afinidade (AC), aplicadas isoladamente ou de forma combinada, para remover impurezas e separar isoformas plasmídicas indesejadas [45–47].

Paralelamente, a cromatografia líquida desempenha um papel fundamental como ferramenta analítica, permitindo o controlo rigoroso da qualidade ao longo de todo o processo produtivo e assegurando a consistência do produto final [45].

Apesar da sua eficácia, a purificação de pDNA é limitada pela semelhança físico-química com as impurezas e pelas restrições das fases estacionárias convencionais. Na maioria das vezes é necessária a aplicação de múltiplas etapas cromatográficas para atingir a qualidade farmacêutica [43,47].

1.4.2.1. Cromatografia de afinidade

A AC é uma técnica de separação em fase líquida baseada em interações altamente seletivas e reversíveis entre o ligando, imobilizado na fase estacionária, e a molécula-alvo presente na amostra. Este ligando, frequentemente um agente de ligação biologicamente relacionado, pode interagir com o alvo por diferentes mecanismos/interações, como pontes de hidrogénio, interações iónicas ou hidrofóbicas, permitindo a sua distinção face a outros componentes com propriedades físico-químicas distintas. Exemplos clássicos incluem as interações anticorpo–antígeno, enzima–substrato e hormona–receptor, o que confere à técnica elevada especificidade e capacidade de purificação mesmo a partir de misturas complexas [43,48].

O formato mais comum da AC é o modo on/off, no qual o alvo é inicialmente retido e depois libertado da coluna de forma controlada. Primeiro, aplica-se um tampão que ajusta o pH e a força iónica para criar as condições ideais de ligação entre o ligando e a molécula-alvo. Nestas condições, o alvo fica retido na fase estacionária, enquanto os restantes componentes da amostra são lavados e removidos. De seguida, a eluição do alvo é realizada introduzindo um tampão de eluição, que pode ser aplicado por passos ou gradiente. A libertação pode ocorrer por alterações não específicas nas condições da fase móvel, como pH, força iónica ou composição, ou por um processo de eluição biospecífica, no qual um agente específico compete pelo mesmo sítio de ligação, deslocando a molécula-alvo [48].

1.4.2.2. Cromatografia de troca iónica

A AEC é amplamente utilizada na purificação de pDNA devido à sua eficácia na separação de ácidos nucleicos com base na densidade de carga. A técnica explora interações eletrostáticas entre os grupos fosfato do DNA, carregados negativamente, e grupos dos ligandos da matriz cromatográfica, carregados positivamente [43,49]. Durante o carregamento, utiliza-se uma força iónica moderada para evitar a ligação de impurezas com menor densidade de carga, como proteínas e RNA de baixo peso molecular, que são eliminadas no fluxo de passagem (*flow-through*). O pDNA e outras moléculas com maior densidade de carga são retidos e eluídos gradualmente através do aumento da concentração de sal na fase móvel. O RNA tende a eluir antes do pDNA, enquanto o gDNA, se presente em fragmentos de tamanho semelhante, pode co-eluir, representando um dos principais desafios desta técnica. A conformação também influencia a separação:

a isoforma sc, mais compacta e com maior densidade de carga, elui após as isoformas relaxadas, promovendo a separação e o enriquecimento da conformação biologicamente ativa do pDNA [49].

1.4.2.3. Cromatografia de exclusão molecular

A SEC é uma técnica amplamente utilizada para separar moléculas com base no seu tamanho, ou mais especificamente, no seu raio hidrodinâmico. O princípio de separação é relativamente simples. Assim que amostra começa a fluir pela coluna, as moléculas grandes são completamente excluídas dos poros da fase estacionária e, por isso, eluem mais rapidamente. As moléculas pequenas penetram totalmente nos poros, retardando-se na eluição, e as moléculas de tamanho intermédio são parcialmente excluídas, sofrendo um retardamento proporcional ao seu grau de penetração nos poros. A separação ocorre exclusivamente pelo tamanho, sem interações físico-químicas adicionais. Esta técnica opera sob condições suaves da fase móvel, preservando a conformação nativa das biomoléculas, e apresenta boa precisão quantitativa. A fase estacionária consiste em partículas porosas de tamanho controlado, frequentemente modificadas com silanos hidrofílicos, grupos diol ou cadeias de polietilenoglicol (PEG) para evitar interações secundárias [50].

1.4.2.4. Cromatografia de interação hidrofóbica

A HIC é uma técnica de bioseparação que explora diferenças de hidrofobicidade entre biomoléculas, permitindo a sua separação seletiva a partir de lisados bacterianos. O princípio baseia-se na força de interação diferencial das várias espécies hidrofóbicas presentes na amostra pela fase estacionária funcionalizada com ligandos hidrofóbicos. A retenção é modulada pela presença de sais neutros em elevadas concentrações, como o sulfato de amónio (SA), que induzem o efeito conhecido como “*salting-out*” [43].

Em solução aquosa, as biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos encontram-se rodeados por uma camada de hidratação que garante a sua solubilidade. A adição de sais neutros faz com que os iões do sal tenham maior afinidade pelas moléculas de água do que as próprias macromoléculas, reduzindo a sua solvatação. Isto resulta na exposição das regiões hidrofóbicas das macromoléculas, favorecendo a sua interação com a resina.

Este efeito, maximizado em concentrações salinas elevadas, promove a adsorção estável à fase estacionária, sustentada sobretudo por forças de van der Waals [51,52].

A eluição ocorre mediante a diminuição gradual da força iónica, que restabelece a camada de hidratação e enfraquece as interações hidrofóbicas, libertando progressivamente as moléculas adsorvidas. Assim, em HIC, altas concentrações de sal favorecem a retenção, enquanto concentrações mais baixas permitem a eluição, de acordo com a hidrofobicidade relativa de cada biomolécula [52].

A escolha do sal e da sua concentração é determinante para a eficiência da separação. Iões fortemente hidratados (anti-caotrópicos) potenciam o efeito de *salting-out* e estabilizam as macromoléculas, enquanto iões fracamente hidratados (caotrópicos) podem ter o efeito oposto. O SA, em concentrações entre 1 e 2,4 M, é o mais utilizado, dada a sua elevada capacidade de promover *salting-out*, alta solubilidade, estabilidade e baixo custo [51].

O processo cromatográfico desenvolve-se em quatro etapas principais: equilíbrio da coluna com tampão salino, aplicação da amostra e lavagem para remoção de componentes fracamente ligados, eluição sequencial das biomoléculas através da diminuição da força iónica, e regeneração da resina para libertar espécies fortemente retidas [43]. A ordem de eluição reflete a hidrofobicidade relativa de cada constituinte [53].

No contexto da purificação de plasmídeos, a HIC permite distinguir o pDNA de impurezas, como RNA, gDNA desnaturado e endotoxinas. O RNA apresenta carácter altamente hidrofóbico devido à exposição das bases nucleotídicas, enquanto o pDNA apresenta baixa hidrofobicidade, uma vez que a maioria das bases está protegida no interior da dupla hélice. Consequentemente, em HIC, altas concentrações de sal permitem que o pDNA permaneça no *flow-through*, enquanto as impurezas se ligam à resina e são eluídas posteriormente mediante a redução da força iónica [53,54].

Em estudos recentes, a HIC demonstrou elevada eficácia e reprodutibilidade em diferentes escalas. Por exemplo, a purificação de um plasmídeo vacinal contra a raiva evidenciou que a técnica pode ser ampliada em mais de 60 vezes sem comprometer a pureza ou o rendimento, atingindo valores próximos de 100% de sc pDNA e recuperações de 95%, com níveis de contaminantes abaixo dos limites regulamentares [54]. De forma semelhante, outros estudos mostraram que a utilização de uma única etapa de HIC, com concentrações otimizadas de SA, é suficiente para obter preparações com mais de 98%

de sc pDNA, isentas de impurezas detetáveis e com rendimentos superiores a 70%, mantendo a eficiência biológica comprovada em ensaios de transfeção [55].

Apesar da sua eficácia, a HIC apresenta limitações, sobretudo pelo uso de elevadas concentrações de SA, que acarreta custos e desafios ambientais relacionados com o seu descarte. Embora alternativas estejam a ser investigadas, nenhuma demonstrou ainda a mesma eficiência na remoção seletiva de impurezas. Não obstante, a técnica continua a ser amplamente utilizada, pois combina elevada capacidade de separação com preservação da integridade estrutural das biomoléculas, mantendo a sua atividade biológica após a remoção do sal [53,56].

A purificação de pDNA constitui uma etapa essencial para a obtenção destes vetores com elevada qualidade, destinados a aplicações terapêuticas e vacinais. Contudo, a presença de elementos bacterianos, como genes de resistência a antibióticos, pode comprometer tanto a segurança como a eficiência da expressão génica em sistemas eucarióticos. Neste contexto, o DNA minicircular (mcDNA) surge como uma alternativa inovadora, derivada do pDNA, mas desprovida de sequências procarióticas. Esta característica potencia o seu desempenho como vetor, ao proporcionar maior segurança, expressão prolongada e eficiência transgénica, consolidando o seu papel promissor em terapia génica e no desenvolvimento de vacinas de DNA [49,55].

1.5. DNA minicircular

O pDNA é composto por duas regiões principais: a unidade de transcrição, que contém o transgene de interesse, e a sequência bacteriana (*backbone*), essencial apenas para a clonagem, seleção e amplificação do vetor de DNA em estirpes bacterianas. No entanto, para aplicações clínicas, estas sequências bacterianas são desnecessárias e potencialmente problemáticas. A presença de genes de resistência a antibióticos, por exemplo, pode facilitar a sua disseminação na microbiota humana, enquanto elementos como motivos CpG não metilados podem desencadear respostas imunitárias indesejadas ou conduzir à silenciamento da expressão do transgene [57,58]. Assim, um dos principais objetivos no desenvolvimento de vetores não virais é eliminar essas regiões, produzindo pDNA sc livre de sequências bacterianas [57].

Neste contexto, o mcDNA surgiu como uma alternativa promissora. Trata-se de uma forma superenrolada de DNA não-viral, obtida a partir de um plasmídeo parental (PP),

cuja produção envolve um processo de recombinação genética que separa de forma específica as regiões bacterianas dispensáveis das sequências eucarióticas [59]. O mcDNA retém apenas os elementos essenciais à expressão em células eucarióticas, como o transgene terapêutico, o promotor e a cauda poli-A [49,60]. A ausência de elementos como o gene de resistência a antibióticos e a origem de replicação bacteriana resulta no mcDNA, mais pequeno, com maior estabilidade, reduzida imunogenicidade e melhor eficiência de transfeção [49,58].

1.5.1. Produção de DNA minicircular

A produção de mcDNA é realizada em estirpes de *E. coli* geneticamente modificadas, como a ZYCY10P3S2T, amplamente utilizadas devido ao seu rápido crescimento, elevada densidade celular e eficiência metabólica [59,60]. Estas estirpes integram sistemas de expressão regulados por L-arabinose, que permitem ativar, de forma controlada, a maquinaria enzimática responsável pela conversão do PP em mcDNA [58].

O PP contém a sequência terapêutica flanqueada por regiões de reconhecimento específicas (attB e attP). Mediante indução com L-arabinose, ocorre a expressão coordenada de duas enzimas-chave: a integrase PhiC31 e a endonuclease I-SceI. A integrase atua sobre os sítios attB e attP, promovendo a recombinação da molécula original em duas estruturas distintas: o mcDNA, contendo apenas a unidade de expressão eucariótica, e o miniplasmídeo (mP), que retém as sequências bacterianas dispensáveis [57,58,61]. Simultaneamente, a endonuclease I-SceI reconhece e corta sítios específicos (SceI) no PP e mP, favorecendo a sua degradação [58,60] (Figura 5).

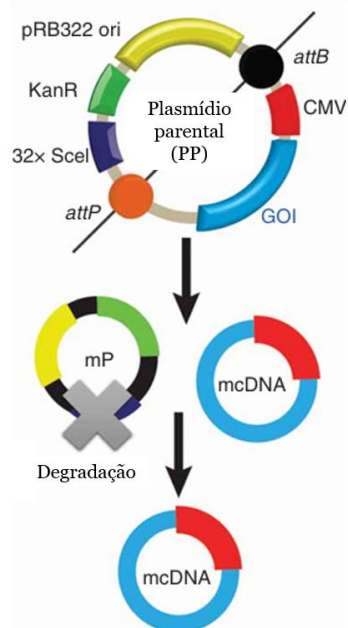


Figura 5. Representação esquemática da produção do vetor de DNA minicircular (mcDNA) a partir do plasmídeo parental (PP) (Adaptado de [60]).

No entanto, este processo de recombinação *in vivo* não é totalmente eficiente, o que pode resultar na presença de resíduos de PP e mP na amostra final. Após a etapa de amplificação, a fase de indução torna-se um parâmetro crítico do processo produtivo. A eficiência da conversão depende da concentração de L-arabinose e do momento da sua adição, sendo que a indução no final da fase exponencial de crescimento celular tem demonstrado melhores rendimentos de mcDNA [59].

Contudo, a coexistência de múltiplas formas de DNA após a recombinação, nomeadamente mcDNA, PP e mP, exige etapas subsequentes de purificação rigorosa para garantir a qualidade e segurança do produto final [59].

1.5.2. Purificação de DNA minicircular

As primeiras metodologias desenvolvidas para a purificação de mcDNA baseavam-se na restrição *in vitro* para linearização do mP, seguida de centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο ou eletroforese em gel de agarose. Embora eficazes à escala laboratorial, estas abordagens não são adequadas para produção em larga escala nem para obtenção de produtos com grau clínico, uma vez que não cumprem os requisitos estabelecidos por entidades reguladoras [62]. Para ultrapassar estas limitações, várias estratégias têm sido

propostas para purificação de sc mcDNA, incluindo protocolos baseados em inserção de sequências específicas no PP, explorando cromatografia de afinidade, e digestão enzimática seguida de HIC. Embora eficazes, estas abordagens exigem PP modificados e, muitas vezes, não apresentam seletividade suficiente para isolar exclusivamente a isoforma sc, além de apresentarem limitações económicas para a escala industrial [61].

Em 2019, foi explorada a cadaverina como novo ligando cromatográfico para purificação de mcDNA, obtendo-se bons resultados de rendimento e pureza, mas com baixa quantidade recuperada, exigindo repetições do processo [59,61]. Posteriormente, a cromatografia de exclusão molecular foi aplicada, alcançando uma maior massa recuperada, com aplicabilidade universal para diferentes pares PP–mcDNA, apesar de corridas longas [59,61]. No geral, as metodologias têm evoluído, mas ainda é necessário desenvolver estratégias mais específicas, seletivas, robustas e de baixo custo para recuperação eficiente de mcDNA puro a partir de amostras complexas [49].

A aplicação de uma estratégia eficaz de purificação de mcDNA depende da composição da mistura de ácidos nucleicos obtida após a lise celular no final do crescimento bacteriano. Ao contrário da produção convencional de pDNA, que gera essencialmente duas isoformas topológicas principais (sc e oc), a produção de mcDNA origina também o mP e resíduos do PP não recombinado, cada um com os seus respetivos topoisómeros. Estas espécies apresentam propriedades físico-químicas e tamanhos muito semelhantes, o que dificulta consideravelmente a sua separação [62].

Enquanto a purificação de vetores plasmídicos convencionais pode recorrer a técnicas cromatográficas indiferentes à estratégia de produção, no caso do mcDNA essas abordagens revelam-se muitas vezes insuficientes, pois o PP e o mP tendem a coeluir com o mcDNA. Assim, torna-se necessária a implementação de etapas adicionais, quer durante a produção, quer no processo cromatográfico, para garantir a obtenção de mcDNA com elevada pureza. Produtos de DNA destinados a aplicações terapêuticas devem ainda cumprir especificações rigorosas quanto ao conteúdo residual de endotoxinas, proteínas da célula hospedeira e gDNA, bem como quanto à integridade, identidade e sequência da molécula [61,62].

Capítulo 2 – Objetivos

O cancro do colo do útero constitui um problema significativo de saúde pública a nível mundial, sendo fortemente associado à infeção persistente por genótipos de alto risco do HPV, como o HPV-16 e HPV-18. Apesar da existência de vacinas profiláticas eficazes, estas não apresentam efeito terapêutico em infeções já estabelecidas, nem eliminam lesões pré-cancerosas ou carcinomas. Neste contexto, as vacinas de DNA surgem como uma estratégia promissora, uma vez que permitem induzir respostas imunitárias humorais e celulares direcionadas contra proteínas virais oncogénicas, como E6 e E7, oferecendo potencial terapêutico.

O principal objetivo deste trabalho é desenvolver estratégias para a obtenção de uma vacina de DNA pura, baseada no genótipo de alto risco HPV-16 que codifica para as oncoproteínas E6 e E7 (multigénica), utilizando colunas cromatográficas de interação hidrofóbica com ligandos de hexil e butil, garantindo um elevado grau de pureza e recuperação, em conformidade com as recomendações das entidades reguladoras.

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

- Produção das vacinas de pDNA e mcDNA: obtenção dos vetores através do sistema recombinante *E. coli* ZYCY10P3S2T, seguida de extração alcalina.
- Otimização da purificação de pDNA: aplicação de colunas de interação hidrofóbica para captura e polimento, avaliando e ajustando as condições de ligação e eluição para maximizar pureza e recuperação do sc pDNA HPV-16 E7/E6.
- Purificação de uma vacina de mcDNA, utilizando as condições cromatográficas otimizadas na purificação do pDNA, avaliando a qualidade do produto final e a eficiência do processo.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Produção de pDNA e mcDNA

3.1.1. Condições de crescimento bacteriano e produção de pDNA

O pDNA foi amplificado através da fermentação da estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T transformada com o plasmídeo HPV-16 E7/E6 (previamente clonado pelo nosso grupo de investigação). O procedimento inicia-se com a inoculação da estirpe em placas de *Luria-Bertani* (LB) agar suplementadas com canamicina (50µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, EUA) e, após crescimento em meio sólido, as colónias foram inoculadas numa pré-fermentação (v=62,5mL) em meio *Terrific Broth* (TB), composto por 20g/L de triptona, 24g/L de extrato de levedura, 4mL/L de glicerol, 0,017M de KH₂PO₄ e 0,072M de K₂HPO₄, a um pH de 7,0, também suplementado com canamicina (50µg/mL). O crescimento bacteriano realizou-se num orbital refrigerado (Agitorb 200 IC; Aralab) a uma temperatura de 42°C com agitação a 250rpm até atingir uma densidade ótica a 600nm (DO_{600nm}) de aproximadamente 2,6.

Com base nesta densidade, foi calculado o volume de pré-fermentação que seria necessário transferir para o meio de fermentação (v=250mL) de forma a iniciar com uma DO_{600nm} de 0,2. A fermentação foi conduzida utilizando uma proporção de ¼ de volume de meio para ¾ de volume de oxigénio, em meio TB suplementado com canamicina (50µg/mL), mantendo as condições de temperatura e agitação (42°C e 250rpm). O crescimento bacteriano foi monitorizado e interrompido no final da fase exponencial, quando a DO_{600nm} atingiu cerca de 5.

No final do processo, as bactérias foram recolhidas por centrifugação (10min, 4°C, 3900rpm) e armazenadas a -20°C para posterior extração.

3.1.2. Produção de mcDNA

Para a síntese de mcDNA, inicialmente realizou-se a fermentação de forma semelhante à do pDNA. Após a fermentação atingir uma DO_{600nm} entre 5 e 6, as células bacterianas foram recolhidas por ciclos de centrifugação de 20min a 2000rpm à temperatura ambiente. O *pellet* bacteriano foi então ressuspendido em meio LB *Broth* contendo 0,01% (m/v) de L-arabinose estéril como indutor e 0,04M de NaOH, com pH ajustado para 7, formando a mistura de indução. Esta suspensão foi transferida para um

erlenmeyer de 1L num volume de 250mL de mistura, e a indução da produção de mcDNA decorre durante 1h a 30°C sob agitação constante de 250rpm.

Após o período de indução, as células foram recolhidas por centrifugação a 3900rpm durante 10min a 4°C. O sobrenadante é descartado, e os *pellets* bacterianos são armazenados a -20°C para posterior extração do mcDNA.

3.2. Lise alcalina modificada

A extração de pDNA e mcDNA foi realizada pelo método de lise alcalina modificada. Após o descongelamento dos *pellets* bacterianos, adicionaram-se 10mL da solução A, de ressuspensão (50mM de glucose; 25mM de Tris-HCl; 10mM de EDTA, pH 8,0) e o conteúdo foi homogeneizado no vórtex. Seguidamente, transferiu-se para um tubo de centrífuga, onde foram adicionados 10mL da solução B, de lise (200mM de NaOH; 1% SDS (m/v)), homogeneizando cuidadosamente e incubando por 5min à temperatura ambiente.

De seguida, adicionaram-se 10mL da solução C, de neutralização (3M de acetato de potássio, pH 5,0), homogeneizando e incubando durante 20min no gelo. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 30min a 20.000g e 4°C, tendo-se repetido esta centrifugação mais uma vez. Os *pellets* resultantes foram descartados.

Para precipitar os ácidos nucleicos e realizar uma concentração da amostra, adicionaram-se 0,7 volumes de isopropanol ao sobrenadante, misturando suavemente e incubando por 30min no gelo. Depois, realizou-se uma centrifugação a 16.000g durante 30min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1mL de Tris-EDTA 10mM, pH 7,0.

Para clarificar a amostra de lisado, adicionou-se SA até atingir uma concentração final de 2,5M, agitando-se suavemente em círculos até à sua dissolução total e incubando por 15min no gelo para precipitação de proteínas e RNA. Finalmente, a amostra foi centrifugada a 16.000g durante 20min a 4°C, recuperando-se o sobrenadante, que foi armazenado em microtubos a -80°C para posterior utilização.

3.3. Purificação de pDNA e mcDNA através de cromatografia de interação hidrofóbica

Os estudos cromatográficos foram realizados no sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suécia), operado com o software UNICORN versão 5.11, que consiste numa unidade compacta de separação acoplada a um computador para controlo e monitorização do processo.

Os tampões utilizados para os ensaios cromatográficos foram preparados com água desionizada de grau ultrapura, purificada com o sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, EUA), filtrados com membranas cujo tamanho de poro era de 0,2µm (Schleicher Schuell, Dassel, Alemanha) e desgaseificados no ultra-som.

Foram utilizadas três colunas de HIC: *Hexyl-650C* (volume de coluna de 1mL), *Butyl-650M* (volume de coluna de 1mL) e *Butyl-650S* (volume de coluna de 5mL) oferecidas pela empresa Tosoh Bioscience GmbH, Alemanha. A coluna *Hexyl-650C* apresenta um tamanho de partícula de 100µm, a *Butyl-650M* de 65µm e a *Butyl-650S* de 35µm, sendo que todas têm um diâmetro de poro de 100 nm.

A caracterização do comportamento cromatográfico de cada coluna com amostras de lisado foi realizada aplicando gradientes decrescentes de SA (3 a 0M). As colunas *Hexyl-650C* e *Butyl-650M* foram equilibradas a um caudal de 2mL/min, enquanto a coluna *Butyl-650S* a 1mL/min.

Após o equilíbrio, as amostras foram injetadas usando um *loop* de 100µL, 200µL ou 500µL, consoante o ensaio e a coluna utilizada. A ligação das biomoléculas às colunas foi avaliada, seguida pela aplicação de diferentes gradientes para promover a eluição das espécies retidas. As frações correspondentes a cada pico foram recolhidas, concentradas, dessalinizadas e analisadas por gel de agarose. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, com monitorização contínua da absorvância a 260nm. As frações recuperadas foram concentradas e dessalinizadas utilizando concentradores centrifugais Vivaspin® 6 (Vivaproducts, Littleton, MA, EUA) a 1200g, 4°C. Após os ensaios cromatográficos, as colunas e o sistema ÄKTA Purifier foram limpos com água Milli-Q. Para o armazenamento, passaram-se 3 volumes de coluna (CV) de etanol a 20% através das colunas, que foram posteriormente mantidas a 4°C até à sua utilização.

A regeneração das colunas cromatográficas foi realizada com 3CV de NaOH 0,5M, seguida de uma incubação à temperatura ambiente durante aproximadamente 15min. Posteriormente, as colunas foram lavadas com 3CV de água Milli-Q. Este procedimento

era realizado, em média, após cada 5 ciclos de utilização, previamente à realização dos ensaios, sendo fundamental para remover resíduos acumulados, evitar perda de capacidade de ligação e assegurar a consistência do desempenho cromatográfico.

3.4. Quantificação de DNA

A quantificação do DNA presente no lisado clarificado e nas frações purificadas foi realizada utilizando a coluna analítica CIMac™ acoplada ao sistema ÄKTA Purifier. Foi utilizada uma curva de calibração construída com padrões de DNA HPV-16 E7/E6 previamente purificados, com concentrações entre 1 e 50 µg/mL, da qual resultou a seguinte equação da reta: $y = 1,2352x + 3,8774$, em que y representa a área do pico (mAU) e x concentração (µg/mL) (Figura 6).

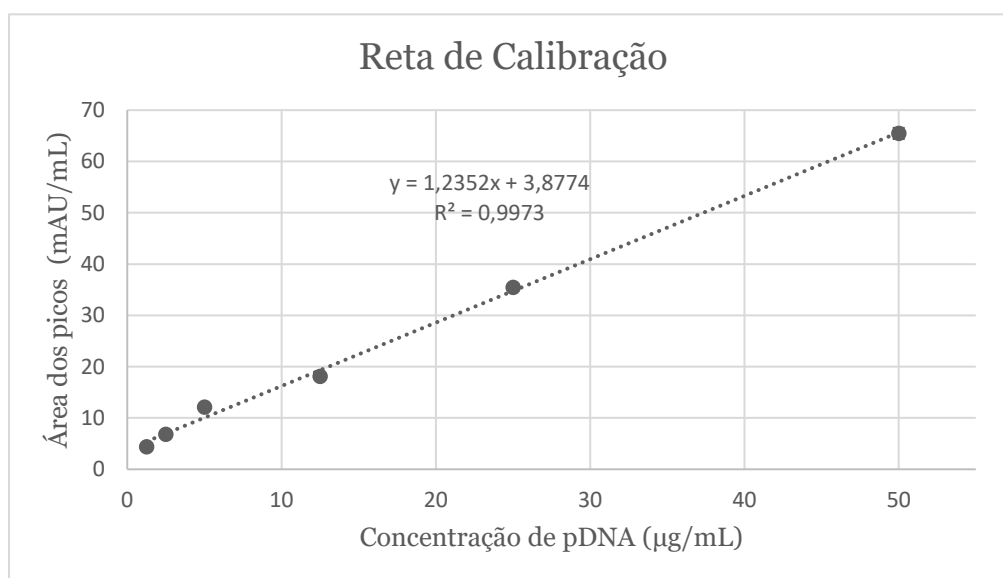


Figura 6. Curva de calibração com padrões de DNA (1 - 50 µg/mL). Cada ponto representa a média dos duplicados para cada padrão, incluindo os respectivos desvios padrão.

Para os ensaios analíticos, a coluna foi equilibrada com 300mM NaCl em 100mM Tris-HCl (pH 8,0), e 50µL de amostra foram injetados a um caudal de 0,5mL/min. A eluição foi realizada por gradientes sucessivos de NaCl: 300mM, 430mM, 500mM, 730mM e 1000mM, em 100mM Tris-HCl (pH 8,0), permitindo avaliar o perfil de eluição das diferentes espécies presentes no lisado e nas amostras purificadas.

A percentagem de recuperação de DNA foi determinada de acordo com a equação (1). O grau de pureza é obtido através das áreas dos picos, conforme a equação (2).

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\text{massa de DNA da amostra}}{\text{massa de DNA do lisado}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ pureza} = \frac{\text{área do pico de DNA}}{\Sigma \text{ áreas dos picos}} \times 100 \quad (2)$$

3.5. Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose a 0,8% foi preparado dissolvendo 0,8g de agarose em 100mL de tampão TAE 1× (40mM Tris, 20mM ácido acético e 1mM EDTA, pH 8,0), com adição de 1,2μL de corante Greensafe para visualização do DNA com luz Ultra Violeta (UV). Para análise, foram carregados 20μL de cada fração cromatográfica, previamente diluídos na proporção de 1:2 e misturados com 2μL de *loading buffer*, composto por azul de bromofenol, glicerol a 50% e água Milli-Q.

A eletroforese foi realizada a 120V durante 40min, utilizando tampão TAE 1×. Após a corrida, o gel foi visualizado sob luz UV num leitor FireReader (Uvitec Cambridge, Reino Unido).

Capítulo 4 – Resultados e discussão

O cancro do colo do útero, causado pela infecção persistente por HPV, continua a apresentar elevada prevalência e mortalidade entre mulheres em todo o mundo. Este facto impulsiona a necessidade de desenvolver novas abordagens terapêuticas baseadas em DNA. As vacinas de DNA têm potencial para induzir respostas imunitárias humorais e celulares contra as oncoproteínas virais E6 e E7, responsáveis pela transformação maligna das células infetadas.

O pDNA tem sido o vetor não viral mais utilizado, devido à sua segurança, baixo custo e facilidade de produção. Contudo, apresenta limitações que podem ser superadas pelo mcDNA, considerado um vetor de “nova geração” por reunir vantagens adicionais. Apesar do seu potencial, a purificação de mcDNA ainda exige otimização, sendo a pureza final determinante para aplicação clínica. Neste trabalho, procurou-se melhorar o rendimento e a pureza do mcDNA, aplicando a HIC para a sua purificação. Foram exploradas três colunas, avaliando primeiro o seu desempenho na separação do pDNA das impurezas. O método otimizado com pDNA foi depois aplicado ao mcDNA, de forma a validar a sua eficácia na obtenção desta biomolécula com qualidade adequada para aplicações terapêuticas.

4.1. Biossíntese e extração do pDNA e mcDNA

Os passos iniciais da tecnologia de DNA recombinante influenciam o rendimento do vetor, sendo crucial a escolha do hospedeiro. As condições do meio de crescimento também afetam a estabilidade do plasmídeo e a fisiologia celular. Assim, neste trabalho foi utilizada a estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T transformada com o plasmídeo HPV-16 E7/E6 cultivada em meio TB, a 42°C, durante cerca de 7h, visando atingir elevada densidade celular ($DO_{600nm} > 5$). A curva de crescimento da *E.coli* está representada na Figura 7.

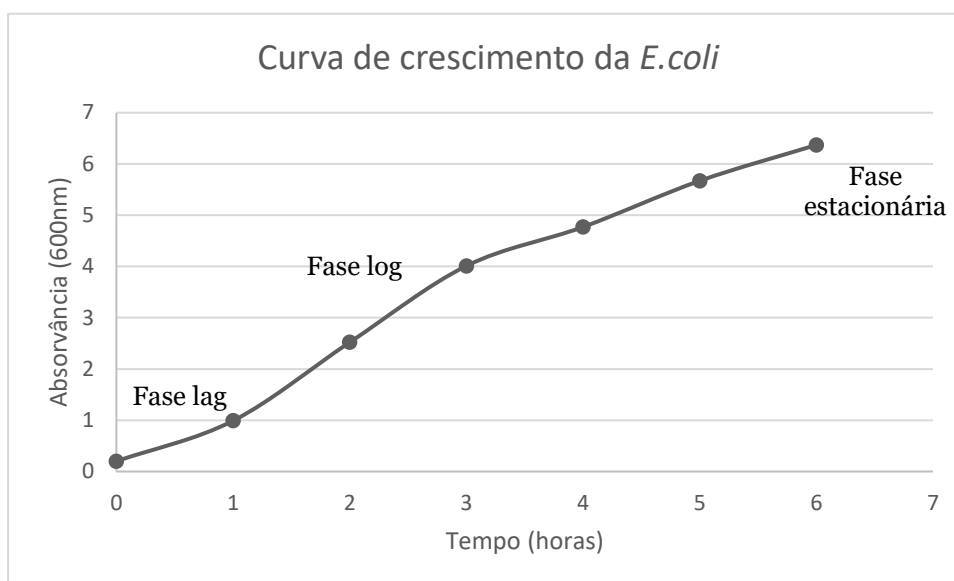


Figura 7. Curva de crescimento da *E. coli* transformada com o plasmídeo parental.

A curva de crescimento bacteriano caracteriza-se por três fases distintas: fase lag, correspondente ao período de adaptação das células ao meio, fase log, marcada pelo crescimento exponencial, e fase estacionária, resultante da limitação de nutrientes e acumulação de metabolitos [63]. Nesta estirpe de *E. coli* geneticamente modificada, a fase estacionária é atingida a uma DO_{600nm} de aproximadamente 5, valor inferior ao observado em outras estirpes bacterianas, como a *E. coli* DH5 α , conhecidas por atingirem densidades celulares mais elevadas [64]. No início desta última fase, a produção de PP é interrompida, as bactérias são recolhidas por centrifugação e armazenadas para posterior lise celular. Para obter o mcDNA, ao invés de armazenar as células, procede-se à sua ressuspensão no meio de indução, que decorre durante mais 1h sob as condições adequadas para promover a recombinação intramolecular do PP em mcDNA e mP.

A recuperação destes produtos visa obter amostras representativas para a purificação cromatográfica. Para isso, os lisados foram clarificados por precipitação dos ácidos nucleicos com isopropanol, e de algum RNA e proteínas com SA. Apesar deste pré-tratamento de clarificação, as amostras mantiveram contaminação por RNA (Figura 8), confirmando a necessidade de purificação adicional por cromatografia.

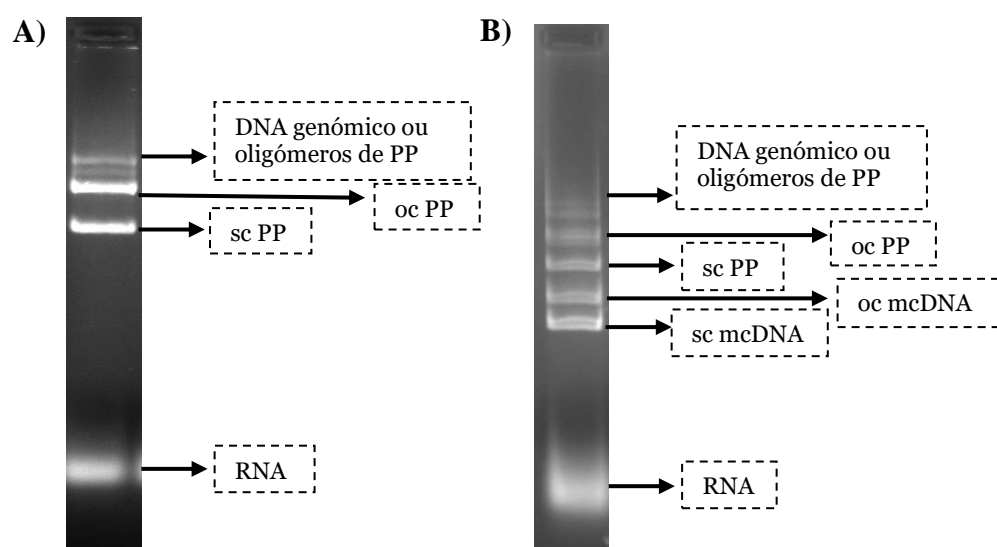


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose das amostras de lisados clarificados. A) Amostra de lisado clarificado de PP; B) Amostra de lisado clarificado de mcDNA.

4.2. Ensaios Cromatográficos

4.2.1. Coluna *Hexyl-650C*

4.2.1.1. Otimização das condições de seletividade

Em HIC, os ligandos hidrofóbicos mais comuns são grupos alquílicos ou arílicos com 4 a 10 átomos de carbono. A extensão da cadeia é normalmente limitada a 10 carbonos para evitar o autoenovelamento, e a natureza do ligando influencia diretamente o desempenho do processo. Entre os ligandos mais utilizados estão o butil (4 carbonos), o octil (8 carbonos) e o fenil, este último capaz de estabelecer interações π - π com resíduos aromáticos na superfície das proteínas. A força da interação hidrofóbica aumenta com o comprimento da cadeia carbonada, seguindo a ordem: fenil > octil > butil [51,52]. A primeira coluna avaliada neste trabalho foi a *Hexyl-650C*, composta por 6 átomos de carbono, conferindo-lhe uma hidrofobicidade moderada. Neste contexto, o ligando hexil apresenta menor hidrofobicidade que octil e fenil, mas superior ao butil, situando-se assim numa posição intermediária em termos de força de interação.

Para caracterizar o comportamento desta coluna num processo de captura de pDNA, foram realizados ensaios cromatográficos utilizando uma amostra de lisado clarificado de PP, com o objetivo de avaliar o perfil de retenção dos diferentes componentes presentes. De acordo com a literatura, concentrações de 1,5 a 2M de SA correspondem a

condições ótimas de separação em colunas de HIC [51,54,65]. Tendo em consideração este ponto de referência, numa fase inicial foi avaliada a capacidade de ligação e eluição da coluna, equilibrando-a com 2M de SA em tampão Tris-EDTA (50mM Tris, 10mM EDTA), pH 8,5, a um caudal de 2,0mL/min. Após a injeção de 100µL de amostra de lisado clarificado de PP, verificou-se que algumas espécies não ligaram à fase estacionária, tendo eluído no *flow-through* durante a etapa de lavagem com a solução de equilíbrio. Em seguida, foi aplicado um gradiente de eluição linear decrescente de 2M a 0M de SA durante 20min, permitindo avaliar o perfil de eluição das amostras e identificar as faixas de concentração nas quais ocorreria a separação mais eficiente dos diversos constituintes (Figura 9).

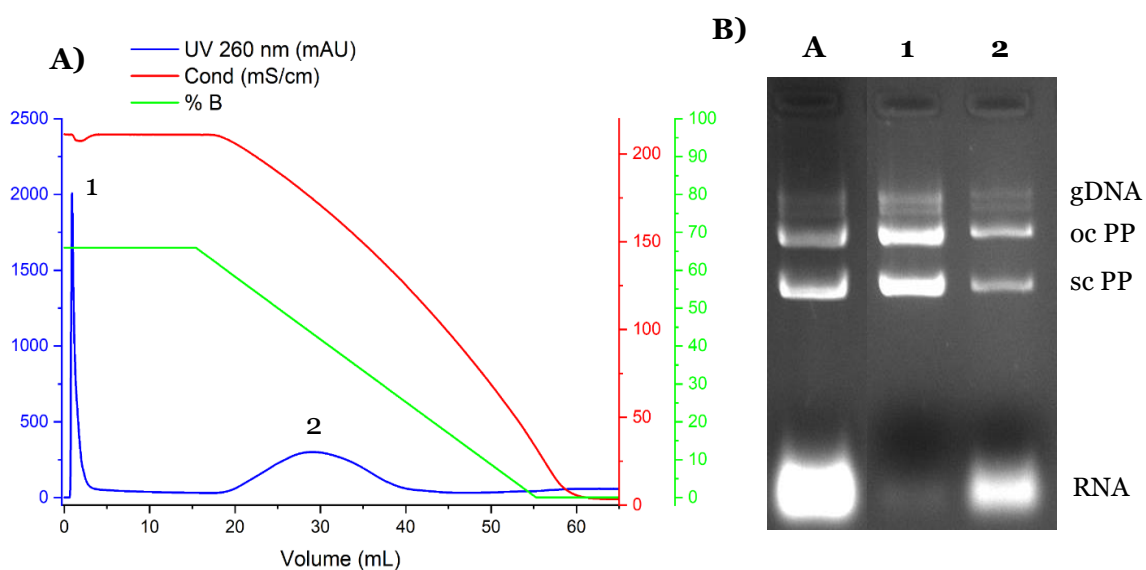


Figura 9. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de amostra de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C* equilibrada com 2M de SA, utilizando um gradiente linear de 20min de 2M a 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 e 2: frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que o pDNA não apresenta afinidade total pela coluna na condição de equilíbrio com 2M de SA, uma vez que foi detetado logo no primeiro pico, antes de iniciar o gradiente de eluição, sugerindo uma fraca interação com os ligandos hidrofóbicos. No segundo pico observou-se a co-eluição de pDNA e RNA, sendo esta fração maioritariamente constituída por RNA, o que se justifica pela sua maior hidrofobicidade e conseqüente retenção na fase estacionária. Estes dados demonstram que, a uma concentração inicial de 2M de SA, uma fração significativa de pDNA não liga à coluna, enquanto o RNA fica preferencialmente retido e só elui com uma

diminuição significativa de SA. Estes resultados estão em concordância com a literatura, que descreve que o pDNA tende a eluir da coluna sem ser retido, ao passo que as impurezas, por apresentarem maior hidrofobicidade, demonstram maior afinidade pela fase estacionária [65].

Face a estas observações, conclui-se que se torna necessário avaliar concentrações salinas iniciais mais elevadas, com o objetivo de reduzir a co-eluição de RNA, aumentando a seletividade do processo, e verificar se, nessas condições, o pDNA apresenta retenção efetiva na coluna. Para este efeito, no ensaio subsequente foi utilizada uma concentração inicial de 3M de SA. De seguida, aplicou-se um gradiente linear de 2,2M a 1,2M, durante 20min, de forma a avaliar a possibilidade de separar, de modo mais eficaz, o pDNA que fica retido na coluna do RNA. Finalmente, a concentração foi reduzida para 0M, promovendo a eluição das espécies que permaneceram ligadas à coluna (Figura 10).

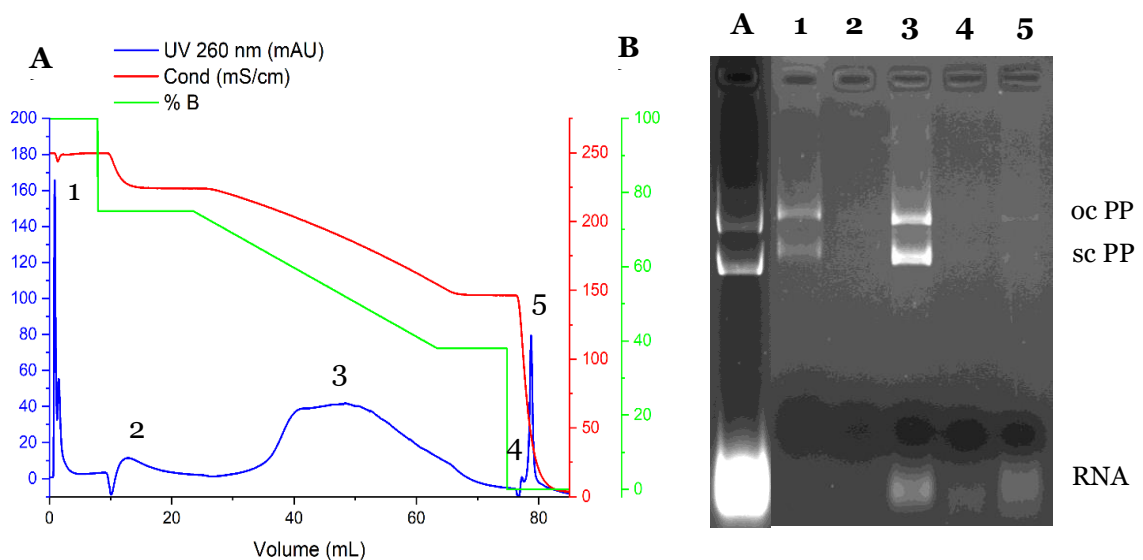


Figura 10. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 3M de SA, seguida de um gradiente linear de 20min de 2,2M a 1,2M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5, e posterior redução para 0M. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 5: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente.

Pela análise dos resultados, verificou-se que, a 3M de SA, uma pequena fração de pDNA não se ligou à coluna e foi detetada no *flow-through*. A 2,2M não ocorreu eluição de DNA ou RNA, sugerindo uma retenção estável de ambas as espécies. Já no terceiro pico, em torno de 1,5M, observou-se a co-eluição de pDNA e RNA, consequência da sua interação semelhante com a fase estacionária, o que compromete a seletividade da separação.

Assim, embora o aumento da concentração inicial de sal tenha favorecido a retenção, a co-eluição entre pDNA e RNA manteve-se significativa, revelando a necessidade de otimização das condições cromatográficas.

Face a estes resultados, e considerando que a utilização de um gradiente linear não permitia separar claramente as espécies no terceiro pico, optou-se por aplicar um gradiente de eluição descontínuo (por passos) decrescente. Foram selecionadas as concentrações de 3M, 2M, 1,5M e 0M de SA, com o objetivo de avaliar se a introdução de patamares definidos permitiria uma separação mais eficiente das diferentes espécies presentes na amostra (Figura 11).

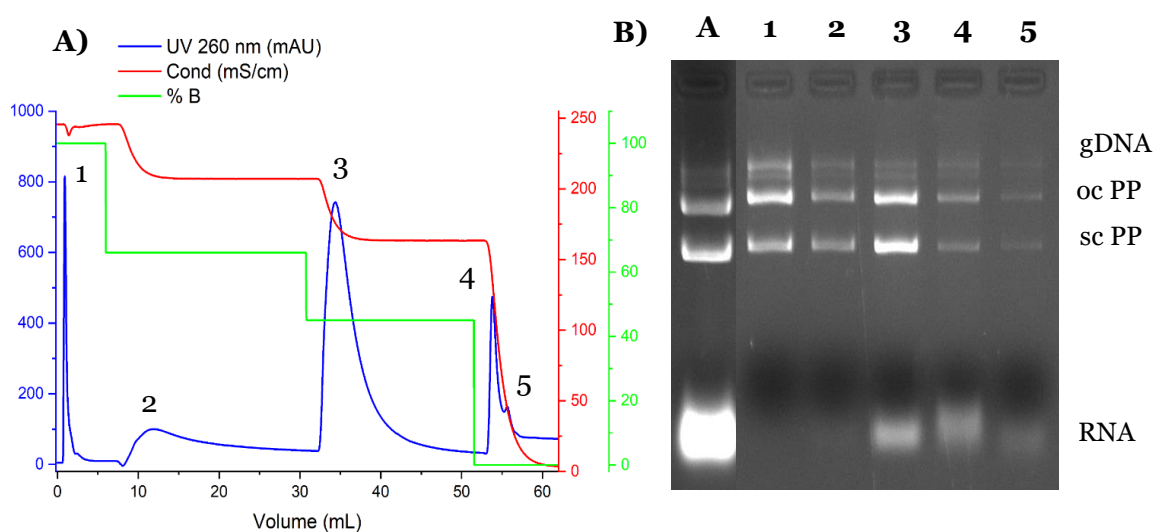


Figura 11. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 3M de SA, seguida de gradientes por passos a 2M, 1,5M e 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 5: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente.

Neste ensaio, verificou-se que os passos correspondentes a concentrações iguais ou inferiores a 1,5M de SA continuavam a resultar na co-eluição de RNA e DNA. Com base nesta observação, o ensaio subsequente teve como objetivo introduzir um patamar intermédio a 1,35M de SA, de forma a avaliar se, nessa condição, seria possível promover uma separação mais eficaz entre as duas espécies. Adicionalmente, a concentração inicial de SA foi reduzida de 3 para 2M, uma vez que, em ambas as condições, a eluição correspondia exclusivamente a DNA, optando-se assim por agregar esses dois picos num único. Além disso, verificou-se que a 3M de SA, uma fração considerável de DNA se liga à coluna e acaba por co-eluir posteriormente com o RNA. Assim, a redução da concentração inicial para 2M visa diminuir a quantidade de DNA que se liga à fase

estacionária, permitindo que este permaneça no *flow-through* e, simultaneamente, potenciando a eluição seletiva de parte do DNA que, em condições mais baixas de sal, tende a co-eluir com o RNA (Figura 12).

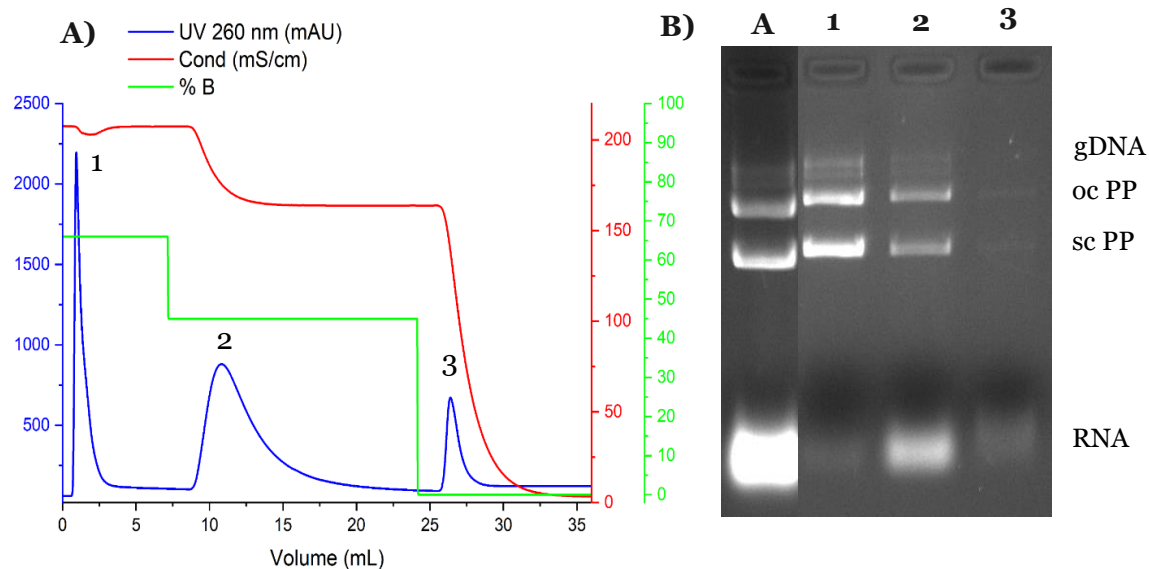


Figura 12. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 2M de SA, seguida de gradientes por passos a 1,35M e 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 3: frações correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma, respetivamente.

Com estes resultados, verificou-se que a redução da concentração inicial para 2M levou, de facto, à eluição da maior parte do DNA no primeiro pico, enquanto uma fração menor foi detetada no segundo pico. Contudo, a 1,35M de SA continua a observar-se co-eluição de DNA e RNA. Face a esta limitação, no ensaio seguinte optou-se por aplicar um gradiente único, reduzindo diretamente a concentração de SA de 2M para 0M. Esta estratégia teve por base a hipótese de que 2M poderia corresponder a um “ponto ótimo”, no qual a maior parte do pDNA é eluído, enquanto apenas uma pequena fração de RNA começa a sair. Assim, a aplicação de uma única etapa permitiria concentrar a eluição das espécies retidas, simplificando o processo de separação (Figura 13).

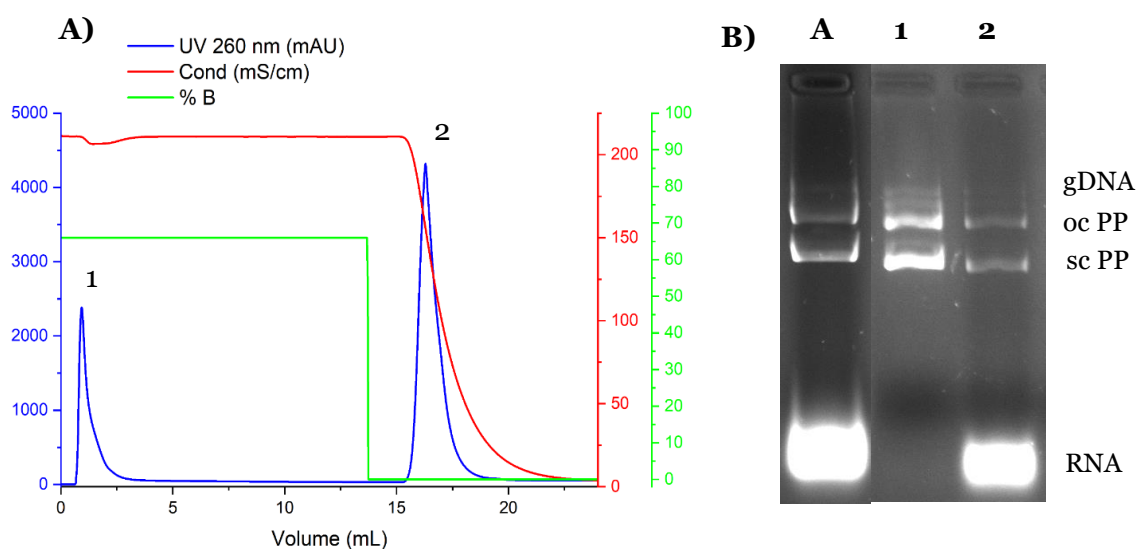


Figura 13. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 2M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para OM de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 e 2: frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

Neste ensaio, verificou-se uma separação eficaz entre DNA e RNA, ainda que uma pequena fração de DNA tenha eluído no segundo pico. A partir deste resultado, os ensaios subsequentes centraram-se na otimização da concentração inicial de SA, com o objetivo de confirmar se 2M seria de facto a condição mais adequada para maximizar simultaneamente a pureza e a recuperação do DNA. Para tal, testou-se, numa primeira etapa, uma concentração inicial de 1,8M de SA (Figura 14).

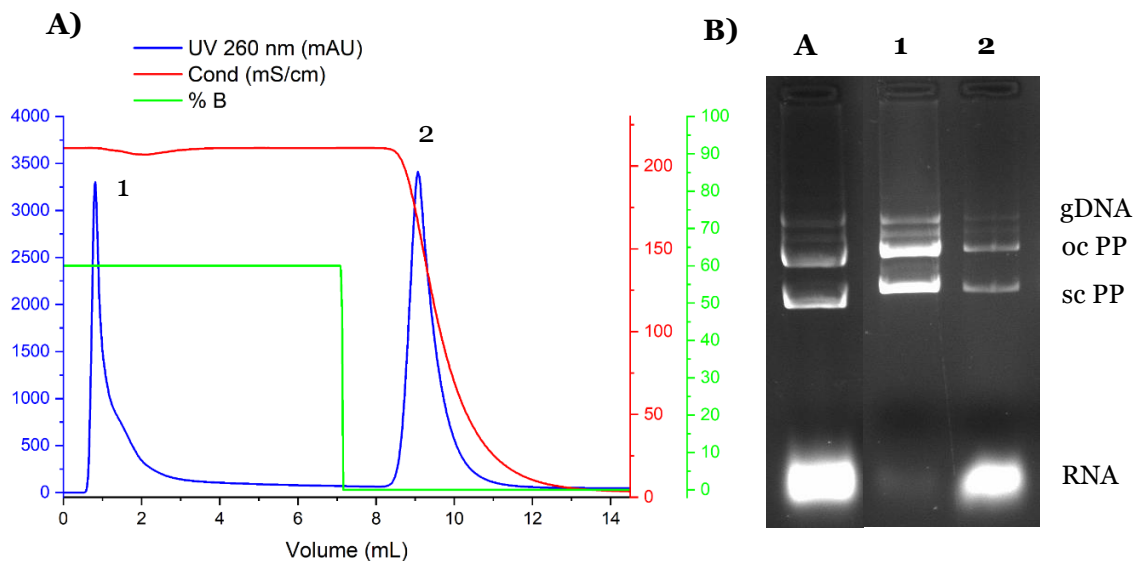


Figura 14. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 1,8M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 e 2: frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

Neste ensaio observou-se que, no primeiro pico, eluía uma quantidade superior de RNA (observando-se um pequeno desdobramento do primeiro pico), em comparação com a condição a 2M, o que poderá comprometer a pureza. Desta forma, no ensaio subsequente a concentração inicial foi aumentada para 2,1M, com o objetivo de avaliar se este ajuste poderia proporcionar uma separação mais eficaz entre DNA e RNA (Figura 15).

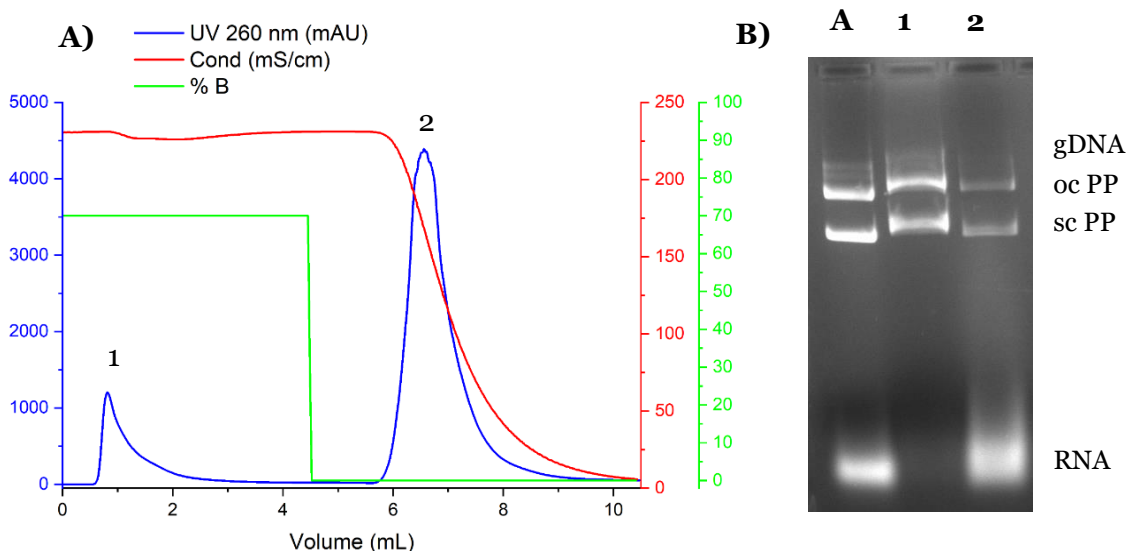


Figura 15. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 2,1M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 e 2: frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

Apesar de, a 2,1M de SA, o primeiro pico não apresentar contaminação aparente por RNA, este aumento de concentração pode comprometer a recuperação do DNA, uma vez que se observa um aumento da quantidade de DNA a eluir no segundo pico, diminuindo a quantidade que estava a sair no primeiro pico. Em consequência, no ensaio subsequente testou-se uma concentração intermédia de 1,9M de SA, com o objetivo de equilibrar a pureza e a recuperação do DNA (Figura 16).

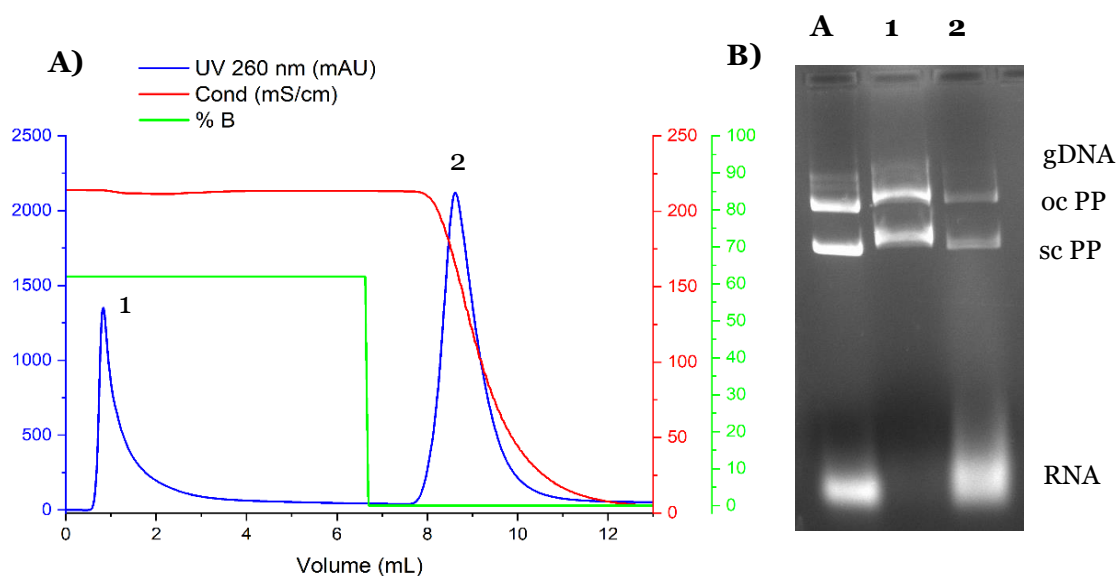


Figura 16. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 1,9M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 e 2: frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

Os resultados deste ensaio revelaram um perfil bastante semelhante ao obtido com a concentração inicial de 2M de SA, saindo o pDNA maioritariamente no primeiro pico e uma fração minoritária no segundo pico. Assim, com base nestes perfis cromatográficos, e respetiva análise qualitativa nos géis de eletroforese de agarose, procedeu-se a uma análise quantitativa do pDNA na coluna monolítica CIMac, com o objetivo de avaliar os valores de pureza e recuperação obtidos em cada condição. Para tal, foram considerados os ensaios realizados com diferentes concentrações iniciais de SA (1,8M, 1,9M, 2M e 2,1M), de forma a identificar qual destas condições se mostraria mais vantajosa em termos de desempenho cromatográfico. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação da pureza e da recuperação do pDNA obtidos a diferentes concentrações iniciais de SA no passo de equilíbrio com a coluna *Hexyl-650C*.

Concentração inicial de SA	Pureza	Recuperação
1,8M	55,40%	45,79%
1,9M	75%	31,54%
2M	77,97%	48,92%
2,1M	80,44%	34,18%

Com os resultados obtidos, concluiu-se que, em termos de pureza, a concentração inicial de 2,1M de SA se revelou a mais favorável. Contudo, esta condição resultou numa recuperação de pDNA consideravelmente reduzida, refletindo o compromisso para a HIC, em que aumentos da força salina podem promover uma maior seletividade, mas à custa do rendimento global.

Desta forma, ao considerar simultaneamente os parâmetros de pureza e recuperação, verificou-se que a concentração inicial de 2M de SA corresponde à condição mais adequada de separação nesta coluna, proporcionando um equilíbrio entre ambos os critérios. Estes resultados estão em concordância com estudos prévios, que também reportaram concentrações próximas de 2M de SA como condições ideais para a separação de ácidos nucleicos em HIC [55,66].

4.2.1.2. Capacidade de ligação

Com a condição de separação otimizada para 2M de SA e utilizando injeções de 100µL de amostra, procedeu-se à avaliação da capacidade de ligação da coluna *Hexyl*, com o objetivo de verificar se a condição de separação se mantinha para volumes superiores de lisado clarificado. Para tal, foram testadas injeções de 200µL (Figura 17) e 500µL (Figura 18).

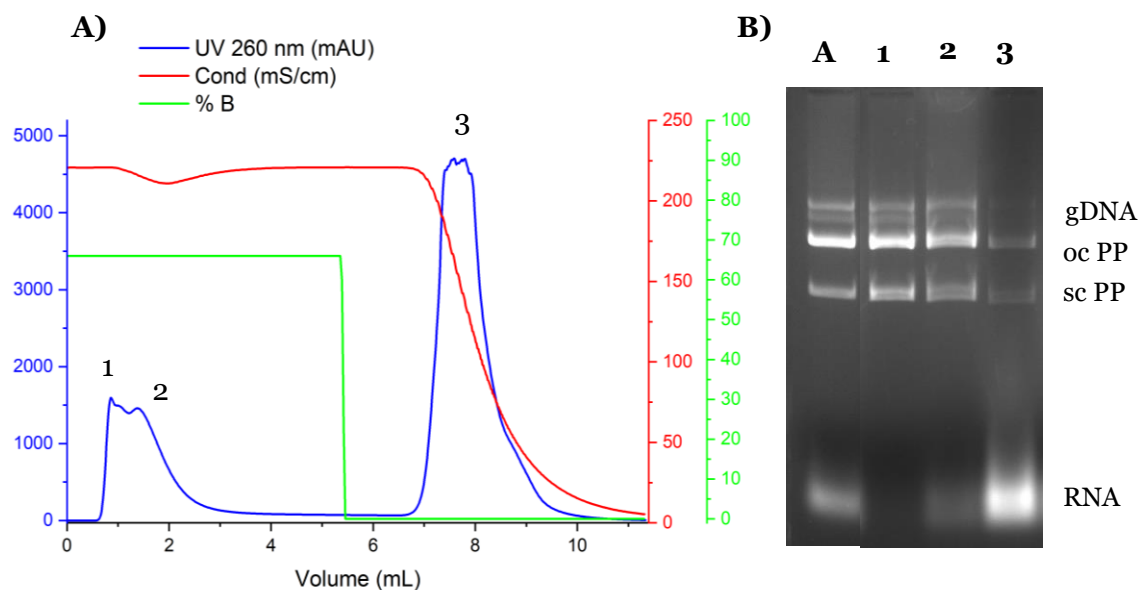


Figura 17. A) Cromatograma obtido após injeção de 200 μ L de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 2M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 3: frações correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma, respetivamente.

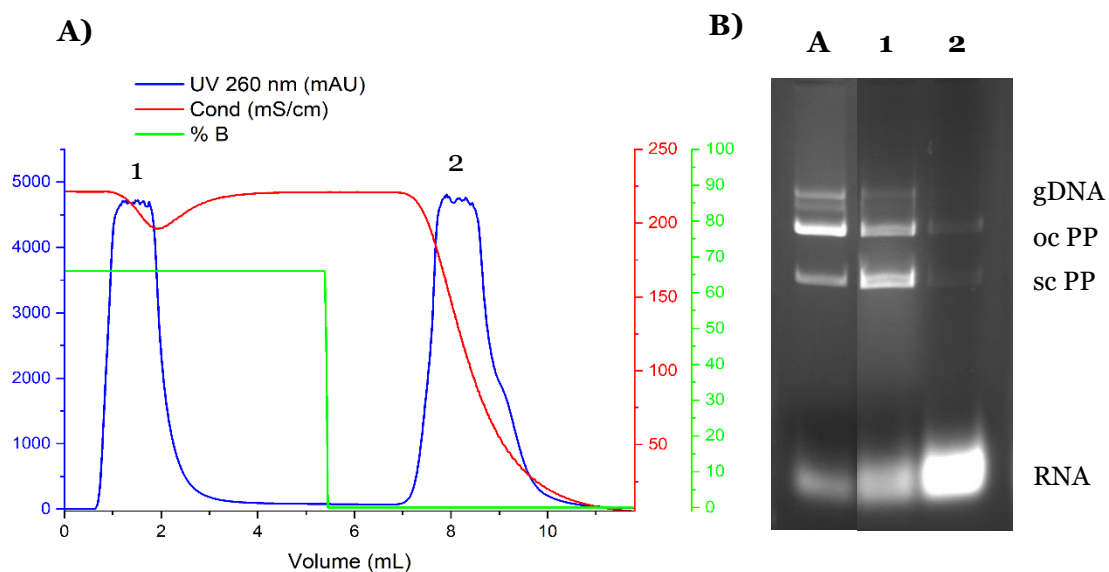


Figura 18. A) Cromatograma obtido após injeção de 500 μ L de lisado de PP na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 2M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 e 2: frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

No ensaio com uma injeção de 200µL, verificou-se que, no primeiro pico, parte do DNA eluiu inicialmente, mas à medida que a lavagem ocorria com o tampão de equilíbrio, houve um desdobramento do pico onde co-eluiu mais pDNA com vestígios de RNA. Embora pareça que a recuperação de pDNA no *flow-through* seja maior que os ensaios anteriores, o grau de pureza da junção das frações eluídas pode estar comprometido, pois as agências reguladoras recomendam ausência de RNA na amostra terapêutica [44,46]. No ensaio com 500µL, ocorreu uma co-eluição considerável de RNA com o pDNA no passo de ligação, confirmando também a inviabilidade desta condição para o grau de pureza pretendido.

Estes resultados indicam que, para volumes superiores a 100µL, a separação do pDNA torna-se ineficaz, devido à saturação da coluna pelo excesso de espécies de RNA presentes na amostra. Assim, a condição ótima de purificação nesta coluna foi definida como a injeção de 100µL de amostra, após o equilíbrio da coluna a 2M de SA, seguida de redução direta para 0M de SA, promovendo a eluição seletiva das impurezas retidas.

4.2.2. Coluna *Butyl-650M*

4.2.2.1. Otimização das condições de seletividade com amostras de lisado clarificado

Inicialmente, esta coluna foi também avaliada numa abordagem de captura, com o objetivo de comparar o seu desempenho com o da coluna *Hexyl*. A *Butyl-650M* apresenta uma hidrofobicidade inferior à *Hexyl*, devido à presença de uma cadeia funcional contendo dois átomos de carbono a menos, o que reduz a intensidade das interações hidrofóbicas com os ácidos nucleicos [52].

A diminuição da hidrofobicidade pode reduzir a afinidade da coluna pelas moléculas mais hidrofóbicas como o RNA, influenciando potencialmente a eficiência de captura, a seletividade e a recuperação. Como resultado, é de esperar que a coluna *Butyl* apresente perfis de eluição distintos, refletindo o equilíbrio entre retenção e seletividade típico das colunas HIC com diferentes níveis de hidrofobicidade [51].

Nesta coluna, foram mantidas as condições experimentais, soluções de equilíbrio e de eluição, caudal e volume de injeção, de modo a garantir uma comparação mais rigorosa com os resultados obtidos na coluna anterior.

De forma semelhante à coluna *Hexyl*, para avaliar o perfil de eluição das diferentes espécies em função da concentração de SA, foi inicialmente aplicado um gradiente linear de 3M a 1M, seguido de um passo para 0M, de limpeza. Esta abordagem permitiu identificar a faixa de concentrações em que cada componente eluía. Partiu-se de uma força salina elevada para garantir a retenção das espécies mais hidrofóbicas, e diminuiu-se gradualmente a força salina para promover a eluição seletiva por ordem de hidrofobicidade das espécies ligadas, culminando na lavagem das impurezas ainda retidas na coluna, somente com tampão sem sal (Figura 19).

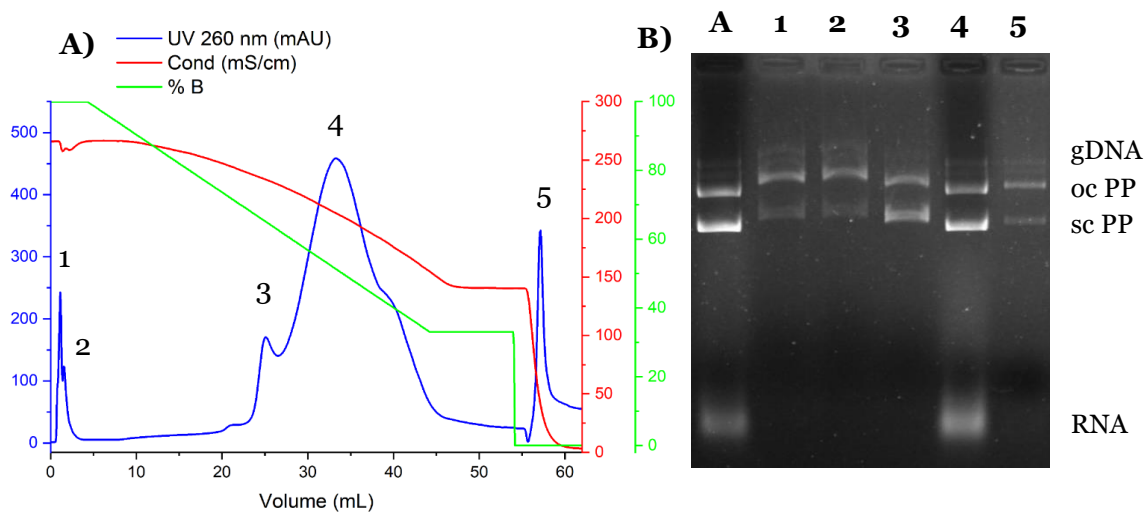


Figura 19. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna *Butyl*-650M, equilibrada com 3M de SA, seguida de um gradiente linear de 20min até 1M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5, e posterior redução para 0M. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 5: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente.

Pela análise destes resultados, observou-se que começa a sair preferencialmente o pDNA na isoforma oc durante o *flow-through*, enquanto o restante pDNA e RNA ficam retidos na coluna no passo de ligação. Durante o gradiente linear decrescente de sal, também se observou que elui primeiro uma fração de pDNA isolado (pico 3) mas o restante pDNA sai juntamente com o RNA no pico 4. Assim, verificou-se que, embora pareça existir alguma seletividade das isoformas de pDNA no início do ensaio com a coluna *Butyl*, de forma semelhante ao observado com a coluna *Hexyl*, o RNA começa a co-eluir com o pDNA por volta de 2M de SA. Com base nesta observação, no ensaio subsequente a concentração inicial de SA foi ajustada para 2,1M, seguida de um gradiente linear até 1M, com o objetivo de tentar promover uma separação/seletividade mais eficaz entre o DNA

e o RNA. Por fim, a concentração foi reduzida para 0M, permitindo a eluição das espécies ainda retidas na coluna (Figura 20).

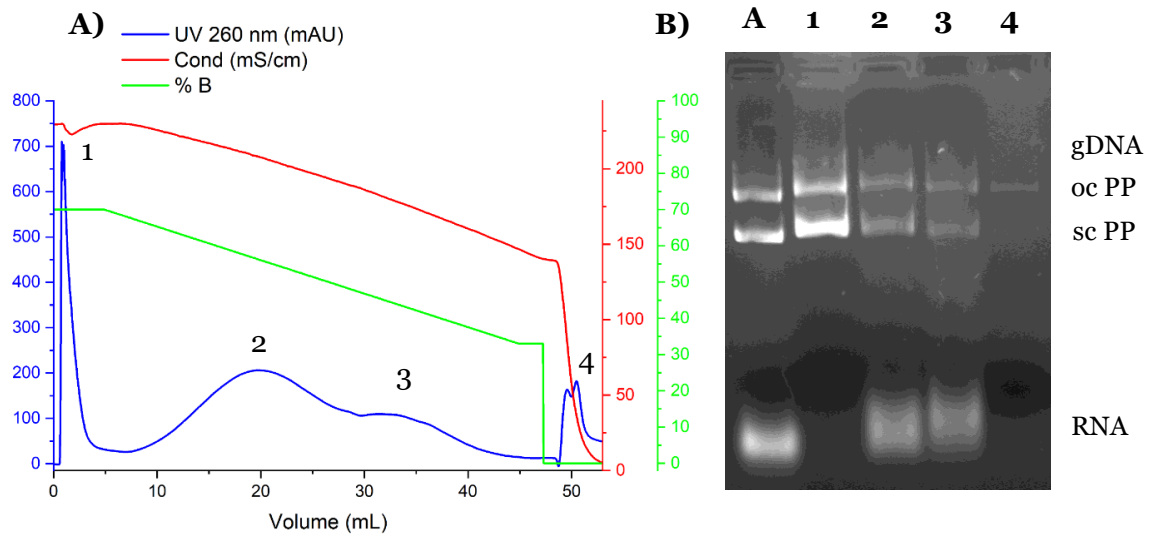


Figura 20. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Butyl*-650M, equilibrada com 2,1M de SA, seguida de um gradiente linear de 20min até 1M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5, e posterior redução para 0M. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 4: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma, respetivamente.

Os resultados obtidos revelaram que não se alcançou uma separação eficiente entre DNA e RNA no intervalo de 2,1M a 1M de SA, tendo-se obtido dois picos, mas com co-eluição de pDNA e RNA em ambos. Perante este resultado, com um gradiente linear de eluição, optou-se por aplicar um gradiente por passos, iniciando com uma concentração de 1,9M de SA, seguida de 1,5M e, por fim, 0M, com o objetivo de promover uma eluição mais controlada e seletiva das espécies presentes na amostra (Figura 21).

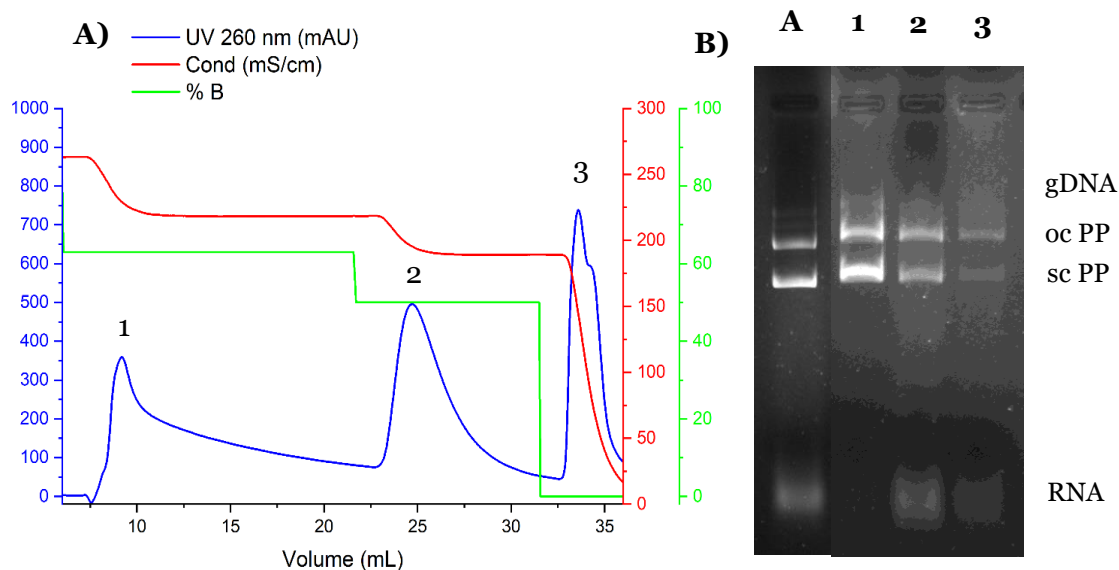


Figura 21. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Butyl-650M*, equilibrada com 1,9M de SA, passando depois para 1,5M, e, por fim, para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 3: frações correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma, respectivamente.

Este resultado mostra uma boa eluição de pDNA no *flow-through*, no entanto, vestígios de RNA parecem já começar a co-eluir. Além disso, o segundo passo a 1,5M não traz vantagem na separação do pDNA e RNA, verificando-se que, de forma semelhante ao observado com a coluna *Hexyl*, um ensaio utilizando apenas dois passos, com uma concentração inicial de 2M de SA, seguida de redução direta para 0M, poderá ser suficiente para explorar a separação entre as duas espécies no passo de ligação (Figura 22).

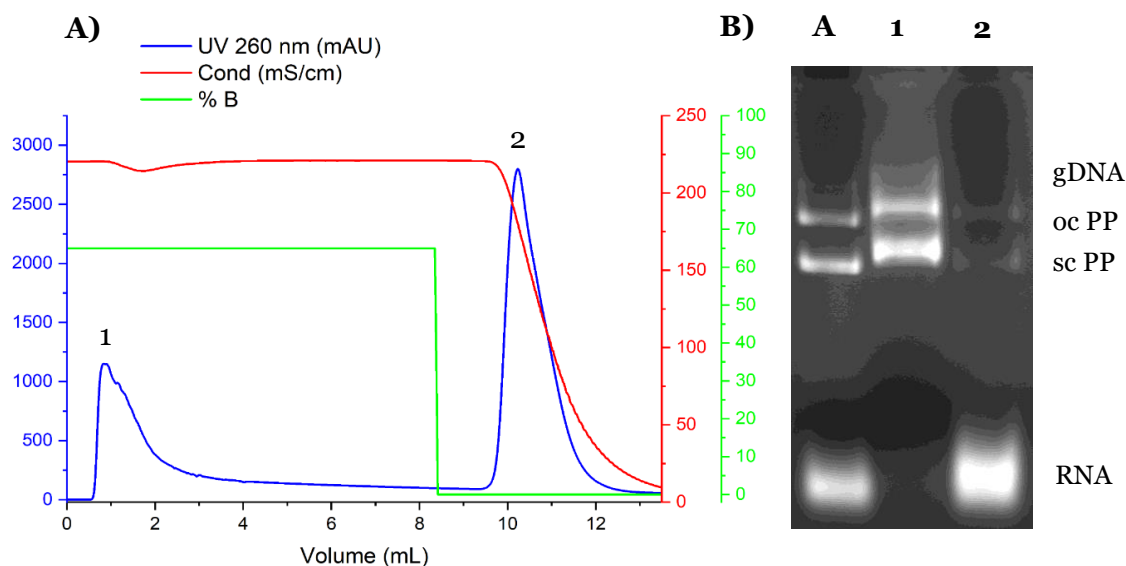


Figura 22. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Butyl-650M*, equilibrada com 2M de SA, e após lavagem das espécies não ligadas, passagem direta para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 e 2: frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respectivamente.

Os resultados deste ensaio demonstraram um perfil cromatográfico semelhante ao observado na coluna *Hexyl* sob as mesmas condições experimentais, caracterizado pela eluição predominante de pDNA no primeiro pico e por uma fração minoritária no segundo pico, evidenciando uma separação eficiente entre pDNA e RNA. Com base nestes resultados, verificou-se que estas colunas apresentam um comportamento semelhante em termos de captura. Para determinar qual destas apresenta um melhor desempenho em termos de pureza e recuperação, procedeu-se à quantificação do pDNA. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação da pureza e da recuperação do pDNA obtidos a diferentes concentrações iniciais de SA na coluna *Butyl-650M*.

Concentração inicial de SA	Pureza	Recuperação
1,9M	46,40%	50,80%
2M	56,54%	46,33%
2,1M	69,48%	41,03%

Os resultados indicam que a coluna *Hexyl-650C* apresenta um desempenho superior na captura de DNA em comparação com a *Butyl-650M*. Este comportamento é consistente com a literatura, que sugere que uma maior hidrofobicidade da fase estacionária promove uma separação mais robusta, retendo de forma mais marcada o RNA, enquanto o DNA apresenta fraca interação com a coluna, eluindo predominantemente no *flow-through* [52]. A coluna *Butyl-650M*, sendo menos hidrofóbica, apresenta uma interação menos intensa com as biomoléculas, o que pode favorecer alguma seletividade entre as isoformas do pDNA, mas também pode levar a uma co-eluição de RNA com o DNA, comprometendo a pureza do produto final.

4.2.2.2. Etapa de captura na coluna *Hexyl-650C* e polimento na *Butyl-650M*

Considerando as suas características, a coluna *Butyl-650M* foi testada numa abordagem de polimento, visando separar isoformas de DNA que possuem ligeiras diferenças de hidrofobicidade entre si. Tendo em conta o fenómeno de super-enrolamento da isoforma sc, pode ocorrer uma maior exposição de bases nesta biomolécula que justifique a sua hidrofobicidade superior à isoforma oc [67]. Neste contexto, uma coluna de menor hidrofobicidade pode proporcionar uma maior resolução na separação dessas isoformas, ao contrário da coluna *Hexyl-650C*, que, devido à sua maior hidrofobicidade, pode não ser tão eficaz em explorar a seletividade de moléculas com características hidrofóbicas semelhantes.

Para avaliar o efeito de polimento do pDNA na coluna *Butyl-650M*, foram inicialmente injetados 100µL de amostra previamente purificada na coluna *Hexyl-650C*, pela estratégia definida anteriormente (equilíbrio com a 2M de SA e eluição com 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5). Aplicou-se um gradiente linear de 3M a 0M de SA na coluna *Butyl-650M*, com o objetivo de mimetizar o comportamento do pDNA oc e sc do ensaio na Figura 19, e investigar o perfil de eluição, identificando quais espécies eluem ao longo desta faixa de concentrações (Figura 23).

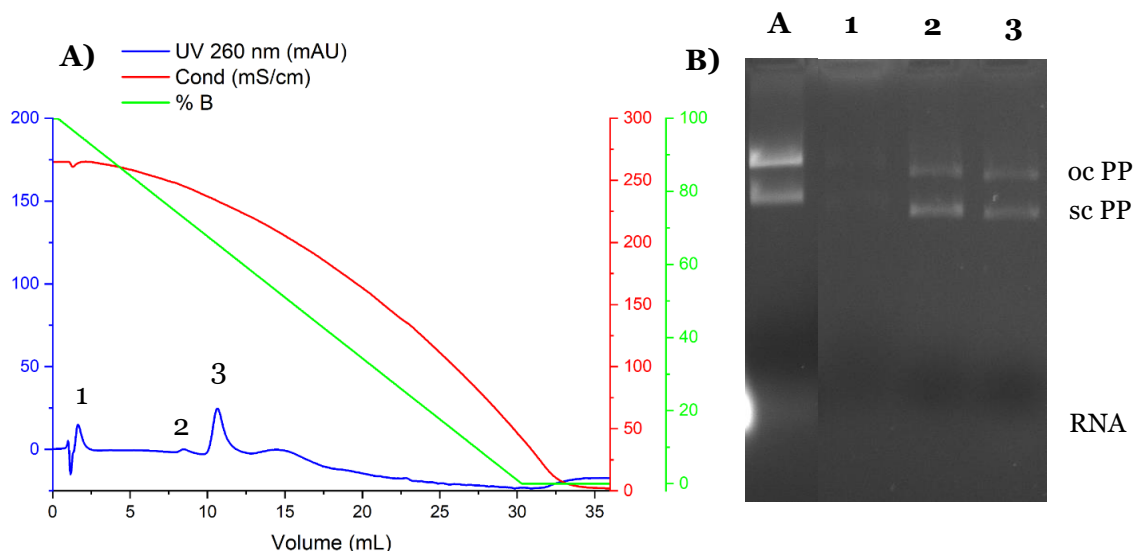


Figura 23. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de amostra (previamente capturada na coluna *Hexyl-650C*) na coluna *Butyl-650M*, equilibrada com 3M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de PP purificado injetada; Linhas 1 a 3: frações correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma, respetivamente.

Com base nos resultados obtidos neste ensaio, embora se observem vários picos no cromatograma, pela eletroforese não ocorreu eluição da isoforma oc no *flow-through* e nos picos 2 e 3 não ocorreu separação das isoformas de pDNA. A ausência de pDNA oc no passo de ligação deste ensaio pode indicar que esta amostra mais simples tem locais suficientes de ligação na coluna, evitando assim o fenómeno de *displacement* que pode ter ocorrido no ensaio da Figura 19 [68]. Para tentar melhorar a resolução, o ensaio subsequente iniciou-se com uma concentração de equilíbrio de 3M de SA, para manter a retenção de todas as biomoléculas, seguida de um passo para 2,1M, e um gradiente linear até 1,5M, com o objetivo de aumentar a resolução do segundo e terceiro pico e avaliar se seria possível promover alguma separação. Por fim, a concentração foi reduzida para 0M, permitindo a eluição das espécies ainda retidas na coluna (Figura 24).

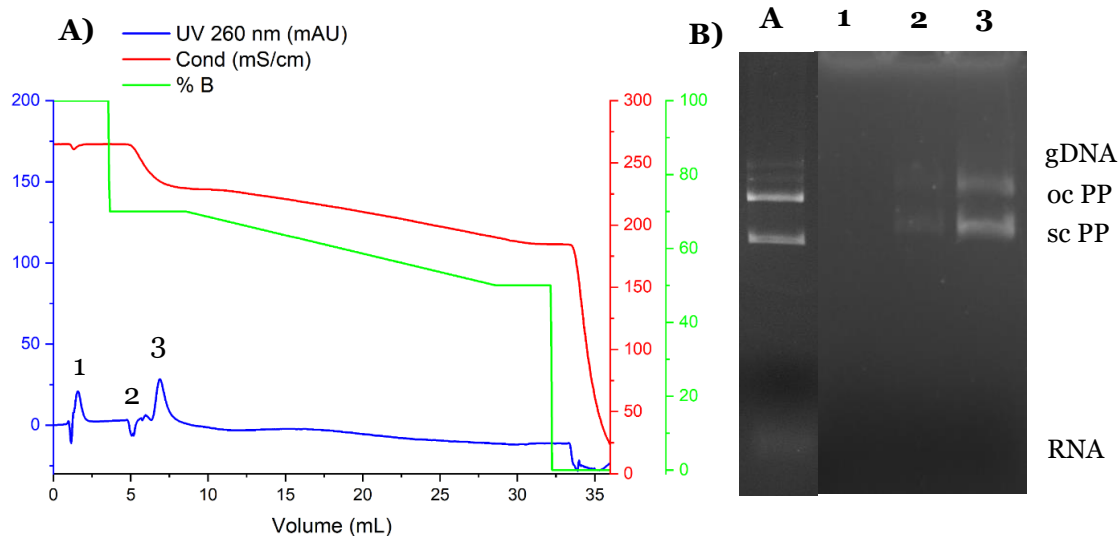


Figura 24. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de amostra (capturada na coluna *Hexyl-650C*) na coluna *Butyl-650M*, equilibrada com 3M de SA, passando depois para 2,1M e realizando-se um gradiente linear de 30min até 1,5M, passando no final para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de PP purificado injetada; Linhas 1 a 3: frações correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma, respetivamente.

Neste ensaio, verificou-se a eluição de todo o pDNA no passo a 2,1M de SA, em que não foi possível separar as isoformas de pDNA. Assim, para tentar melhorar a seletividade realizou-se um ensaio posterior com um tampão de equilíbrio composto por 2,5M de SA e 0,5M de sulfato de sódio. Esta abordagem baseia-se em estratégias descritas na literatura, nas quais a combinação de diferentes sais no tampão de equilíbrio é utilizada para modular a força de interação hidrofóbica e favorecer a resolução de espécies com hidrofobicidade semelhante, aumentando assim a seletividade do processo [69,70]. Para avaliar o efeito desta modificação, aplicou-se novamente um gradiente linear de 3M a 0M de SA com o tampão combinado, permitindo comparar o perfil de eluição obtido com aquele observado quando apenas SA era utilizado, de forma a determinar se a adição do sulfato de sódio influenciava a seletividade e a resolução das isoformas de pDNA (Figura 25).

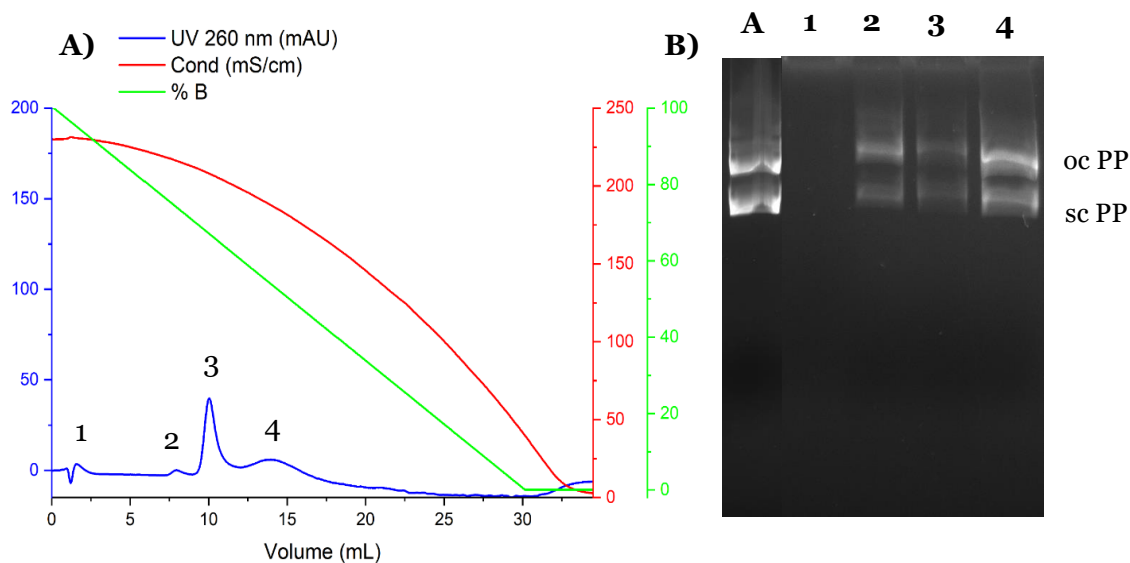


Figura 25. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de amostra (capturada na coluna *Hexyl-650C*) na coluna *Butyl-650M*, equilibrada com 2,5M de SA e 0,5M de sulfato de sódio, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de PP purificado injetada; Linhas 1 a 4: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma, respectivamente.

Visto que não foi possível obter a separação das isoformas de pDNA neste passo de polimento com a *Butyl*, procedeu-se à quantificação do DNA, com o objetivo de avaliar se, apesar da ausência de resolução entre as espécies, teria ocorrido um aumento na pureza, sugerindo a remoção de RNA residual ou de outras impurezas. A amostra previamente purificada na coluna *Hexyl* apresentava uma pureza de 77,97% (Figura 13). No ensaio de polimento utilizando apenas SA, através da aplicação de um gradiente linear de 3M a 0 M, a quantificação revelou uma pureza de 86,43%, acompanhada de uma recuperação de 22,90% (Figura 23). Já no ensaio em que foi adicionado sulfato de sódio ao tampão de equilíbrio, os valores obtidos foram de 85,01% de pureza e 24,88% de recuperação (Figura 25). Estes resultados indicam que o passo adicional de polimento efetivamente contribuiu para a remoção de impurezas e, conseqüentemente, para o aumento da pureza do pDNA. No entanto, verificou-se que a adição de sulfato de sódio não promoveu alterações significativas no perfil cromatográfico, nem resultou em melhorias relevantes nos valores de pureza ou de recuperação quando comparado com a condição em que se utilizou apenas SA.

Embora o passo de polimento com a coluna *Butyl-650M* tenha contribuído para o aumento da pureza global do pDNA, a ausência de separação entre as isoformas evidenciou limitações na seletividade desta etapa cromatográfica. Deste modo, tornou-

se relevante avaliar alternativas que pudessem aprimorar a resolução das diferentes espécies de DNA. Com esse propósito, foi testada a coluna *Butyl-650S*, caracterizada por um menor tamanho de partícula, fator que pode aumentar a eficiência de separação. Esta nova abordagem teve como objetivo verificar se as propriedades estruturais distintas da coluna poderiam resultar num desempenho superior em termos de seletividade e pureza.

4.2.3. Coluna *Butyl-650S*

4.2.3.1. Otimização das condições de seletividade com amostras de lisado clarificado

Dado que não foi observada separação das isoformas, optou-se por testar a coluna *Butyl-650S* (com 5mL de volume). Esta coluna tem o mesmo ligando (butil), mas apresenta um tamanho de partícula inferior (35 μm), o que a difere da *Butyl-650M* (65 μm). Esta característica pode potencialmente melhorar a seletividade e a eficiência de separação, devido ao aumento da área superficial. Partículas de menor tamanho reduzem a difusão dos analitos, resultando em picos cromatográficos mais estreitos e definidos. A área superficial total das partículas da fase estacionária desempenha um papel crucial no desempenho da separação. Materiais com maior área superficial proporcionam maior capacidade de retenção, melhor resolução e uma separação global mais eficiente em comparação com aqueles que apresentam uma área superficial inferior [71].

Numa fase inicial, foi realizada uma abordagem de captura, com o objetivo de comparar o seu desempenho com o das colunas previamente testadas. As condições experimentais foram mantidas, nomeadamente as soluções de equilíbrio e de eluição, bem como o volume de injeção. O caudal utilizado foi de 1mL/min. O primeiro ensaio consistiu no equilíbrio da coluna com 2,4M de SA, para tentar explorar o fenómeno de *displacement* pela isoforma oc no passo de ligação. De seguida foi aplicado um gradiente linear de 30min até 0,9M e, por fim, uma redução até 0M, permitindo avaliar a eluição seletiva das espécies retidas na coluna (Figura 26).

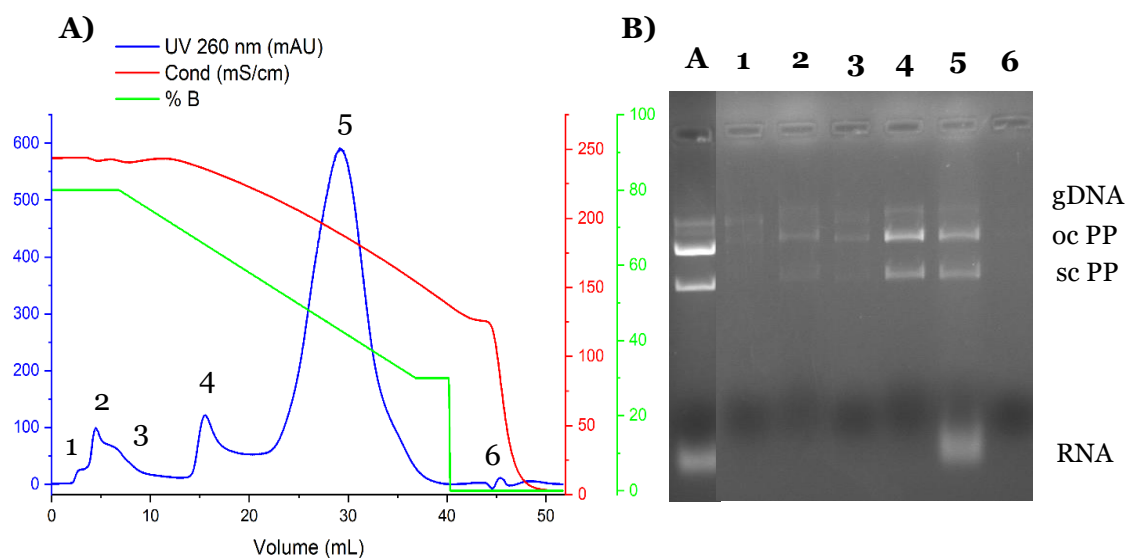


Figura 26. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Butyl-650S*, equilibrada com 2,4M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0,9M, passando no final para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 6: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do cromatograma, respetivamente.

Neste ensaio, verificou-se que, algum DNA de elevado peso molecular e algum pDNA oc, saiu logo no passo de ligação, mas maior parte do DNA ficou ligado, e foi somente eluído durante o gradiente linear no pico 4 e co-eluído com RNA no pico 5. Comparando este resultado da coluna *Butyl-650S* com o da Figura 19 com a *Butyl-650M*, não se torna muito evidente uma melhoria significativa na seletividade entre as diferentes espécies de ácidos nucleicos presentes na amostra de lisado clarificada. Comparando estes resultados com a coluna *Hexyl*, continua a estar consistente e a confirmar que a natureza e a intensidade hidrofóbica do ligando são determinantes no perfil cromatográfico, influenciando diretamente tanto a eluição como o potencial de separação das diferentes espécies nucleotídicas [51,52].

De forma semelhante ao observado nas outras colunas, o RNA começou a eluir com cerca de 1,5M de SA, enquanto parte do DNA foi eluído aproximadamente a 2M. Com base nesta observação, no ensaio subsequente a concentração inicial de SA foi reduzida para 2,1M, seguida de um passo a 1,5M, com o objetivo de avaliar se seria possível promover alguma separação das espécies. Por fim, a concentração foi diminuída para 0M, permitindo a eluição das espécies retidas na coluna (Figura 27).

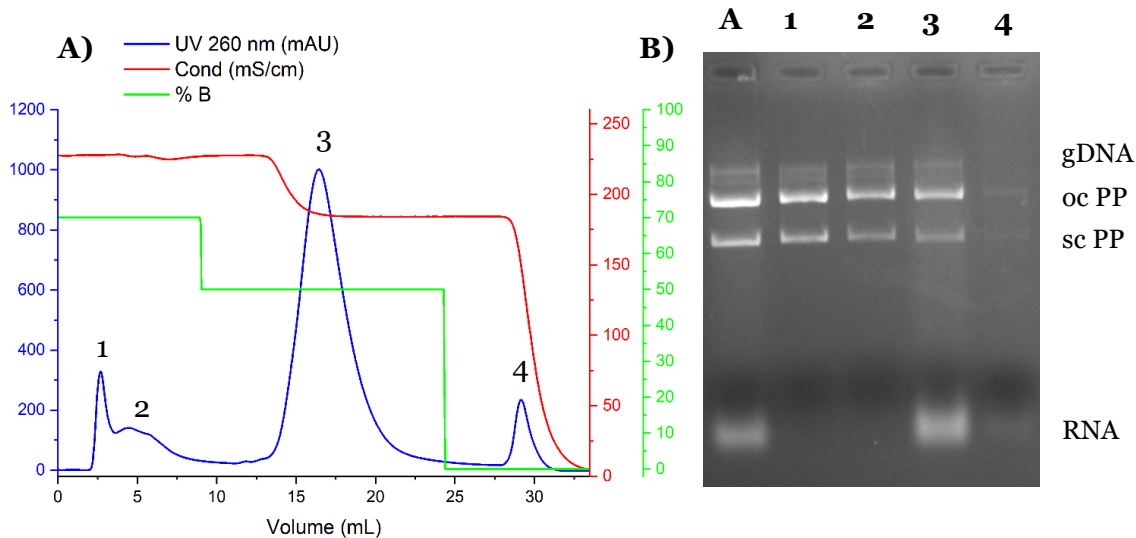


Figura 27. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Butyl-650S*, equilibrada com 2,1M de SA, passando depois para 1,5M, e, por fim, para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 4: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma, respectivamente.

Visto que, no terceiro pico a 1,5M de SA, ainda se perde muito DNA que co-eluiu com o RNA, poderá ser necessário aumentar a concentração de SA para melhorar a separação. Assim, no ensaio subsequente, utilizou-se uma concentração inicial de 2,5M de SA, com o objetivo de determinar em que ponto o DNA começava a eluir. Posteriormente, aplicou-se um passo a 1,8M de SA para avaliar se, a esta concentração, já ocorreria a eluição do RNA, permitindo assim analisar a seletividade do processo (Figura 28).

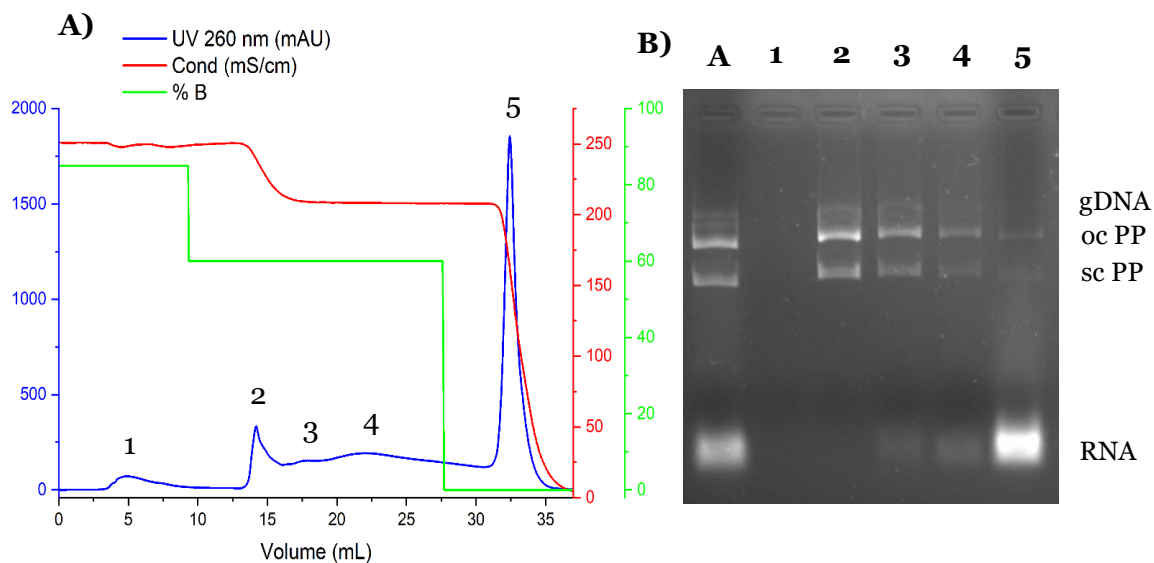


Figura 28. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Butyl-650S*, equilibrada com 2,5M de SA, passando depois para 1,8M, e, por fim, para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 5: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respectivamente.

Visto que, a 2,5M de SA, ainda não se observou a eluição do DNA, e a 1,8M sai DNA mas começa a co-eluir algum RNA posteriormente, no ensaio seguinte a concentração inicial foi ajustada para 2,4M, e o segundo passo foi aumentado para 2M (Figura 29).

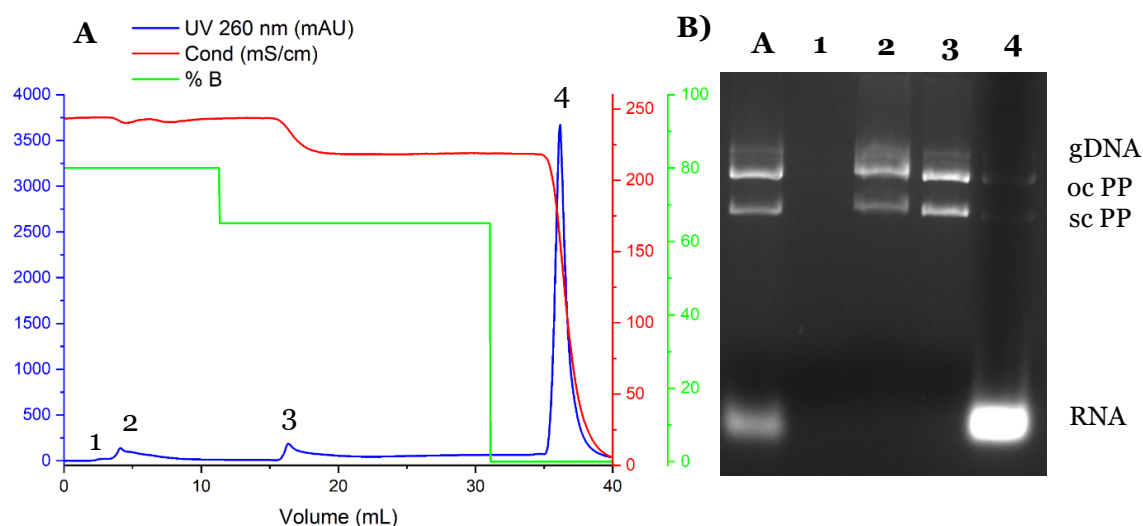


Figura 29. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de lisado de PP na coluna *Butyl-650S*, equilibrada com 2,4M de SA, passando depois para 2M, e, por fim, para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 4: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma, respectivamente.

Verificou-se que, a 2M de SA, foi possível recuperar DNA sem contaminação aparente por RNA. Assim, no ensaio subsequente, optou-se por testar somente dois passos e começar o equilíbrio com uma concentração inicial de 1,9M de SA, com o objetivo de combinar os dois primeiros picos num único e avaliar se, a uma força salina inferior a 2M, já ocorreria a eluição de RNA. Posteriormente, a concentração foi reduzida diretamente para 0M de SA, de modo a promover a eluição do RNA retido na coluna (Figura 30).

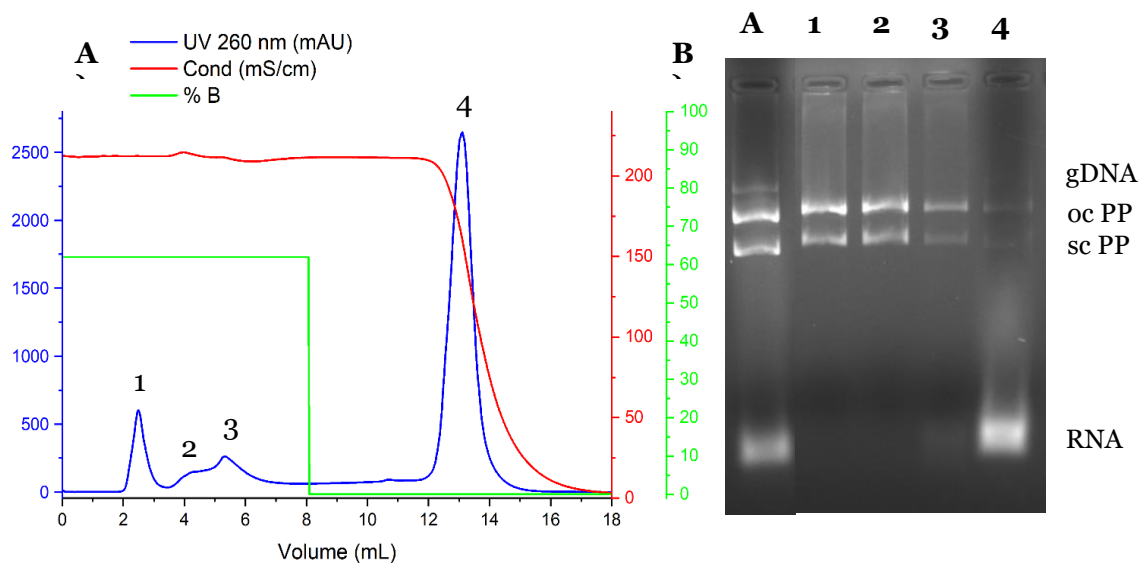


Figura 30. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de lisado de PP na coluna *Butyl-650S*, iniciando com uma concentração de 1,9M, passando diretamente para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de PP injetada; Linhas 1 a 4: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma, respetivamente.

Com este ensaio, concluiu-se que, embora uma pequena fração de RNA comece a eluir na mesma faixa de concentrações de SA que o DNA, a sua saída ocorre num pico distinto, separado dos principais picos de DNA. Este comportamento sugere que, apesar da proximidade na eluição, é possível discriminar as duas espécies e, conseqüentemente, recuperar frações de DNA com maior pureza antes da co-eluição parcial com RNA. Os dois primeiros picos, que não apresentavam sinais de contaminação por RNA, foram quantificados para avaliação da pureza e da recuperação do DNA, permitindo a comparação direta com os resultados obtidos nas restantes colunas. A quantificação revelou uma pureza de 83,41%, indicando uma separação mais eficiente em relação às outras colunas. Contudo, a recuperação foi limitada, com um valor de 29,34%. Assim, concluiu-se que, apesar da maior pureza alcançada, a coluna *Hexyl* continua a apresentar

o melhor desempenho global para uma etapa de captura de pDNA, com a condição ótima de separação a 2M de SA.

4.2.3.2. Etapa de captura na coluna *Hexyl-650C* e polimento na *Butyl-650S*

Em seguida, esta coluna foi avaliada numa abordagem de polimento, seguindo o mesmo procedimento aplicado à coluna *Butyl-650M*, com o objetivo de verificar se poderia apresentar melhores resultados em termos de seletividade e resolução, seja na separação de isoformas ou na remoção de possíveis resíduos de RNA. Para tal, foram injetados 100µL de amostra previamente purificada na coluna *Hexyl* a 2M de SA, aplicando-se posteriormente um gradiente linear de 3M a 0M, durante 30min (Figura 31).

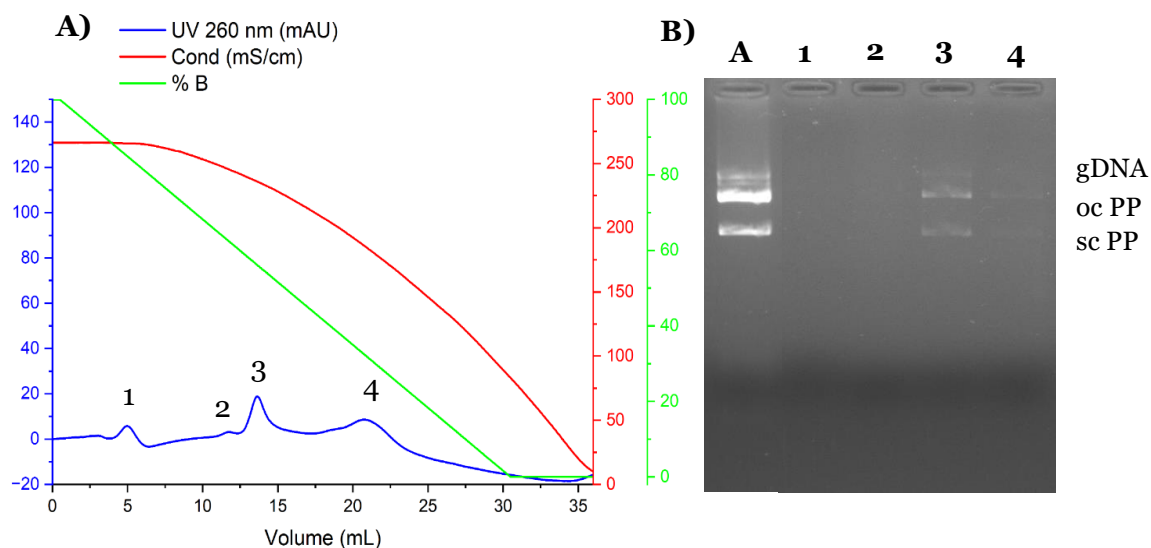


Figura 31. A) Cromatograma obtido após injeção de 100µL de amostra (capturada na coluna *Hexyl-650C*) na coluna *Butyl-650S*, equilibrada com 3M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de PP purificado injetada; Linhas 1 a 4: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma, respetivamente.

Os resultados obtidos parecem semelhantes aos observados com a coluna *Butyl-650M*, mas a amostra parece mais diluída e difícil de visualizar a sua composição na eletroforese. Assim, no ensaio seguinte optou-se por aplicar um gradiente linear de 2,1M de SA até 0,6M, com o objetivo de tentar melhorar a resolução entre as espécies. Além disso, foi injetado um volume superior de amostra (200µL), de forma a avaliar de maneira mais robusta o perfil cromatográfico e confirmar com maior fiabilidade a

composição de cada pico (Figura 32). Para tal, realizaram-se dois ensaios de captura na coluna *Hexyl*-650C, de modo a ter um volume de amostra suficiente para a injeção nesta etapa de polimento na coluna *Butyl*-650S.

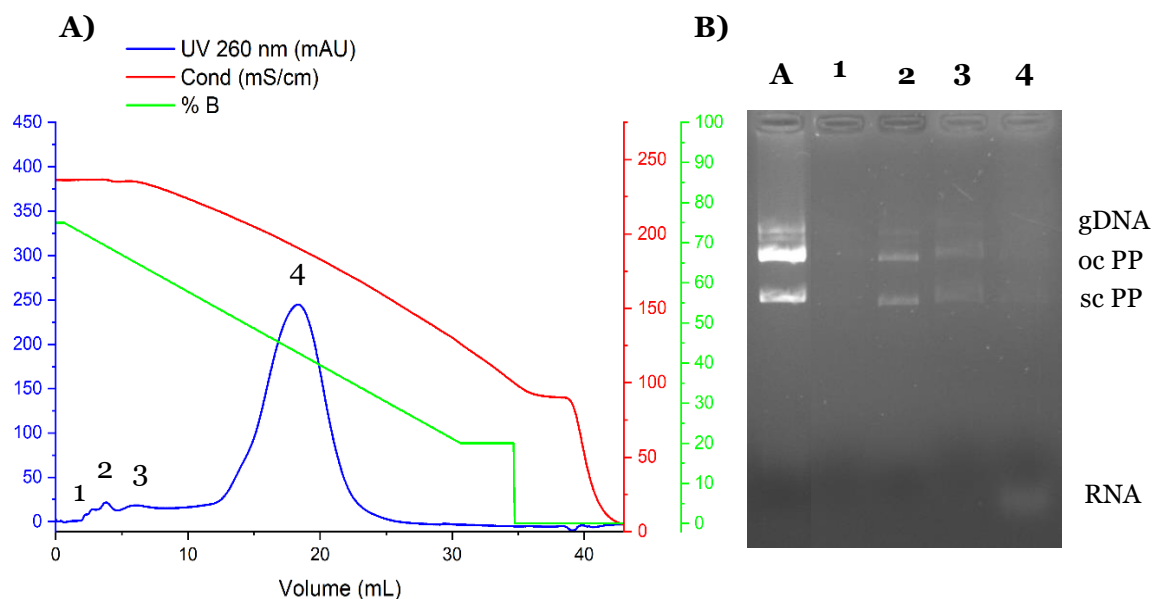


Figura 32. A) Cromatograma obtido após injeção de 200 μ L de amostra (capturada na coluna *Hexyl*-650C) na coluna *Butyl*-650S, equilibrada com 2,1M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0,6M, passando depois para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de PP purificado injetada; Linhas 1 a 4: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma, respetivamente.

Neste ensaio, observou-se que, ao aumentar o volume de injeção, os resíduos de RNA presentes na amostra previamente purificada na coluna *Hexyl* foram eliminados aproximadamente a 1,5M, correspondendo ao quarto pico cromatográfico. No ensaio subsequente, o volume de injeção foi desta vez aumentado para 500 μ L, com o intuito de avaliar a natureza das frações correspondentes aos três primeiros picos. Para isto, realizaram-se três ensaios de captura na coluna *Hexyl*, de forma a ter um volume suficiente de amostra a injetar. Estes aumentos no volume de amostra, tanto neste ensaio como no anterior, foram tidos em conta nos cálculos para a quantificação da pureza e recuperação. Neste ensaio, optou-se por aplicar um gradiente linear de 3 a 0M (Figura 33).

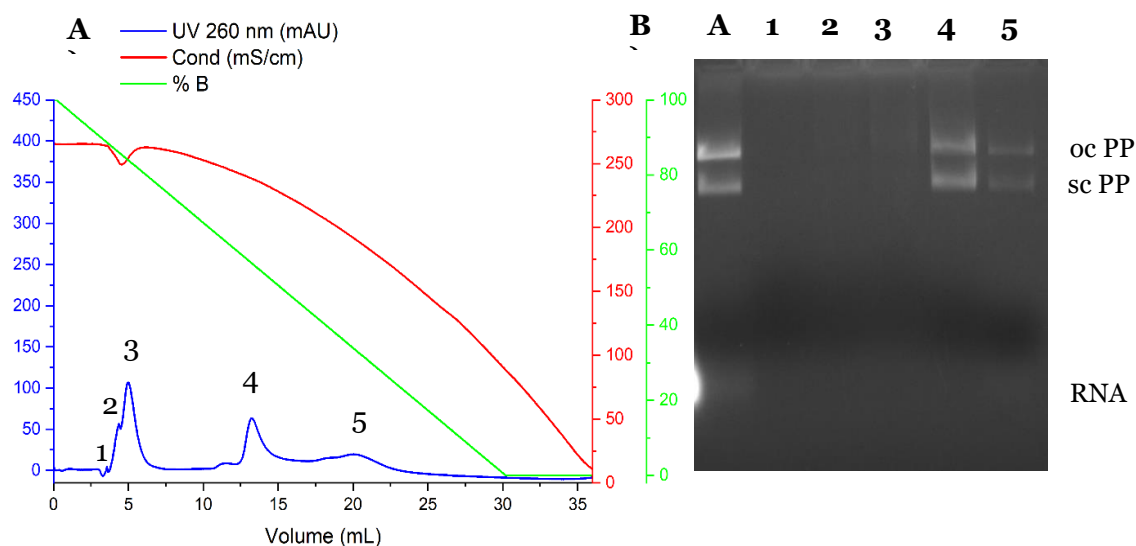


Figura 33. A) Cromatograma obtido após injeção de 500µL de amostra (capturada na coluna *Hexyl-650C*) na coluna *Butyl-650S*, equilibrada com 3M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de PP purificado injetada; Linhas 1 a 5: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente.

Com este ensaio, verificou-se que a eluição do DNA ocorreu a uma concentração aproximada de 2M, enquanto, no ensaio anterior, se tinha concluído que os resíduos de RNA eluíam em torno de 1,5M. Assim, infere-se que o quinto pico corresponderia ao RNA, o quarto pico ao DNA, e as três frações do primeiro pico parecem conter pDNA oc ou oligómeros de pDNA. Neste ensaio o pico relativo ao RNA não é tão evidente como o do ensaio anterior, possivelmente devido a possíveis variações na composição das amostras entre os ensaios (integridade do RNA, degradação parcial), que podem influenciar a intensidade do pico. Deste modo, procedeu-se à análise do pico 4 para a quantificação do pDNA, com o objetivo de avaliar o seu desempenho e compará-lo com o obtido na coluna *Butyl-650M*, de forma a determinar qual das duas colunas apresenta melhor desempenho em termos de pureza e recuperação.

Tendo em conta que a amostra injetada nesta coluna apresentava uma pureza de 77,97%, a quantificação do pDNA nesta etapa de polimento revelou uma pureza de 91,55%, indicando que ocorreu, de facto, uma eliminação adicional de impurezas. A comparação do desempenho das colunas *Butyl-650M* e *Butyl-650S* para polimento encontra-se representada na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação da pureza e da recuperação do pDNA obtidos após a etapa de polimento nas colunas *Butyl-650M* e *Butyl-650S*.

Coluna	Pureza	Recuperação
<i>Butyl-650M</i>	86,43%	22,90%
<i>Butyl-650S</i>	91,55%	23,85 %

Estes resultados demonstraram que a coluna *Butyl-650S* apresenta um desempenho superior à *Butyl-650M*, uma vez que permite obter DNA com maior pureza e ligeiramente melhor recuperação, embora esta se mantenha bastante baixa em ambas as colunas.

4.3. Purificação de mcDNA

Com as condições de captura e polimento otimizadas para o pDNA, bem como a seleção das colunas mais apropriadas para esses passos, aplicaram-se estas condições à amostra de lisado clarificado de mcDNA. Para a etapa de captura, utilizou-se a coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 2M de SA, na qual foram injetados 100 μ L de lisado de mcDNA, seguindo-se posteriormente a eluição a 0M (Figura 34).

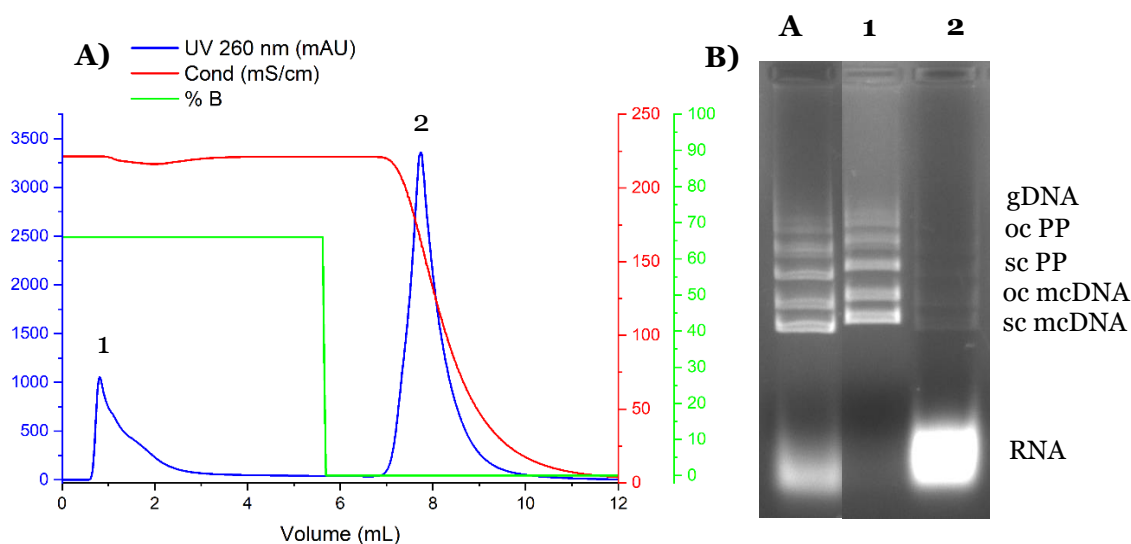


Figura 34. A) Cromatograma obtido após injeção de 100 μ L de amostra de lisado clarificado de mcDNA na coluna *Hexyl-650C*, equilibrada com 2M de SA, e realizando posteriormente um passo para 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de lisado de mcDNA injetada; Linhas 1 e 2: frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

Os resultados de captura na coluna de hexil demonstram que o perfil obtido com o PP se mantém com o mcDNA, obtendo a eluição maioritária de DNA no *flow-through* e o RNA no segundo pico. A quantificação do primeiro pico revelou uma pureza de 75,17% e uma recuperação de 43,62%, valores que estão em concordância com os obtidos para a amostra de PP. Posteriormente, procedeu-se ao passo de polimento na coluna *Butyl-650S*, aplicando-se um gradiente linear de 3 a 0M, com uma injeção de 500µL da amostra previamente obtida na etapa anterior (Figura 35). Para isto, da mesma forma que foi realizado para o PP, realizaram-se três ensaios de captura na coluna *Hexyl*, de forma a ter um volume suficiente para a injeção na coluna *Butyl*.

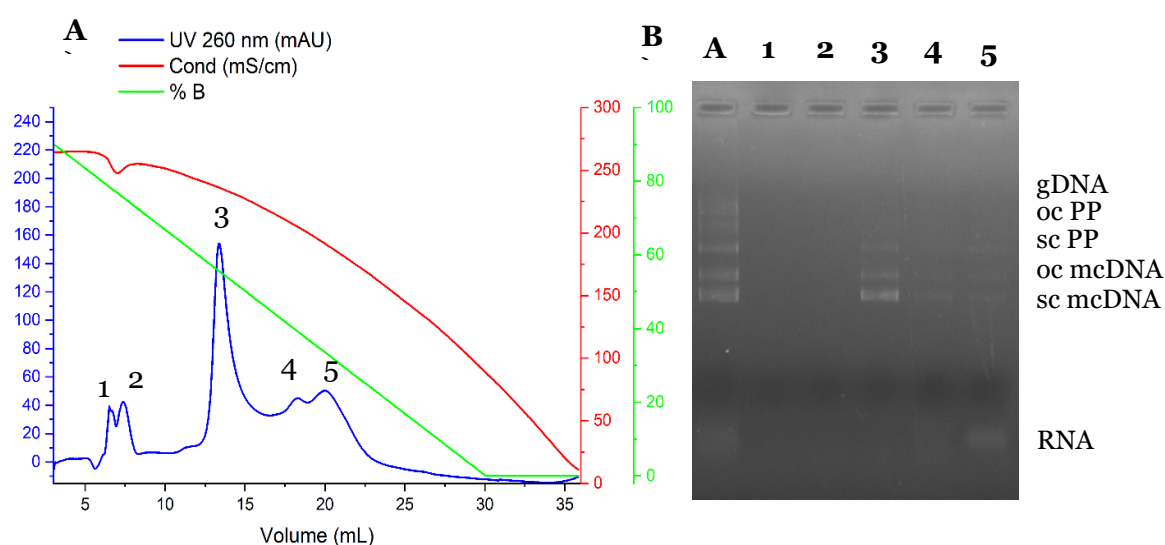


Figura 35. A) Cromatograma obtido após injeção de 500µL de amostra (de mcDNA capturada na coluna *Hexyl-650C*) na coluna *Butyl-650S*, equilibrada com 3M de SA, realizando-se um gradiente linear de 30min até 0M de SA em tampão Tris-EDTA, pH 8,5. B) Análise dos picos do cromatograma por eletroforese em gel de agarose. Linha A: amostra de mcDNA purificado injetada; Linhas 1 a 5: frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados com a amostra de PP na Figura 33. Verificou-se que várias espécies de DNA (mcDNA e PP em diferentes isoformas e eventualmente oligómeros de PP) eluíram no terceiro pico, aproximadamente a 2M de SA, enquanto o RNA eluí em torno de 1,5M de SA. Neste ensaio, também não se verificou separação de isoformas do mcDNA nem distinção entre mc e PP. No entanto, a quantificação do terceiro pico indicou uma pureza de 90,01%, sugerindo que ocorreu uma eliminação adicional de impurezas, sobretudo de RNA. A recuperação obtida foi de 24,23%, valor que se encontra em concordância com os resultados obtidos com a amostra de PP na abordagem da etapa de captura na *Hexyl-650C* e polimento com a coluna *Butyl-650S*.

Comparando estes resultados com os observados na literatura, observa-se que a pureza obtida é satisfatória, embora o rendimento ainda esteja abaixo do esperado. Estudos anteriores demonstraram que colunas monolíticas com ligando DEAE permitiram separar mcDNA de impurezas com uma recuperação de cerca de 50%, enquanto colunas monolíticas modificadas com cadaverina aumentaram a recuperação para 78,6%. Por sua vez, a SEC utilizando a matriz Sephacryl SF-1000 possibilitou recuperar mcDNA com 66% de rendimento [59]. De um modo geral, a recuperação de mcDNA permanece relativamente baixa, evidenciando a necessidade de desenvolver novas abordagens e métodos que permitam a sua purificação de forma mais eficiente.

Capítulo 5 - Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho foram avaliadas diferentes resinas de HIC com o objetivo de otimizar a separação e purificação de pDNA e mcDNA, considerando a eliminação de impurezas como RNA e a possibilidade de discriminação entre isoformas. Foram testadas colunas com diferentes ligandos hidrofóbicos e diâmetros de partícula, incluindo *Hexyl-650C*, *Butyl-650M* e *Butyl-650S*, de forma a compreender o comportamento das amostras em distintas condições de SA e a explorar potenciais estratégias de captura e polimento.

Os resultados obtidos mostraram que a coluna *Hexyl-650C*, caracterizada por uma hidrofobicidade moderada devido à presença de seis carbonos no seu ligando, apresentou um desempenho globalmente superior em termos de captura. A concentração de 2M de SA destacou-se como condição mais eficaz para promover a separação de DNA com eliminação significativa de RNA, permitindo alcançar purezas superiores a 77%, e uma recuperação de cerca de 48%. Já as colunas *Butyl*, apesar de apresentarem algum potencial na separação entre DNA e RNA em concentrações próximas de 2M, revelaram recuperações mais baixas e menor eficácia global numa etapa de captura.

De forma consistente, verificou-se que a redução da concentração inicial de SA para valores próximos de 1,9–2,1M conduziu a perfis cromatográficos onde o DNA e o RNA eluíam em picos distintos, ainda que com alguma sobreposição em determinadas condições. Este facto confirmou que a seletividade das colunas depende da força iónica e do equilíbrio entre retenção e eluição.

Contudo, a realização isolada da etapa de captura na coluna *Hexyl-650C* não foi suficiente para atingir níveis de pureza compatíveis com os requisitos regulamentares exigidos para aplicações terapêuticas de pDNA e mcDNA. Assim, tornou-se necessária a implementação de etapas adicionais de polimento, destinadas à remoção de impurezas residuais. Para esse fim, foram exploradas as colunas *Butyl-650M* e *Butyl-650S*, ambas com ligandos menos hidrofóbicos, característica que poderia favorecer a separação de biomoléculas com hidrofobicidades semelhantes.

Nos ensaios com a coluna *Butyl-650M*, foi obtida uma pureza de 86,43% e uma recuperação de 22,90%, enquanto a *Butyl-650S* apresentou valores ligeiramente superiores, com 91,55% de pureza e 23,85% de recuperação. Estes resultados demonstram que a etapa de polimento contribuiu efetivamente para um aumento da pureza, embora sem promover a separação das isoformas de DNA. Além disso, as

recuperações significativamente reduzidas observadas nestas condições representam uma limitação importante para a sua aplicação em escala industrial.

Em suma, este estudo demonstrou o potencial da HIC para a purificação de pDNA/mcDNA, evidenciando a importância da escolha adequada das condições de SA para alcançar uma separação seletiva e eficiente. Ainda que persistam desafios relacionados com a recuperação, os resultados obtidos fornecem uma base sólida para otimizações futuras, contribuindo para o desenvolvimento de processos de purificação mais eficazes e adequados às exigências da produção de DNA para fins biomédicos.

Como perspectivas futuras, a otimização de parâmetros operacionais, incluindo o caudal, a composição das soluções tampão, a temperatura e o pH, deverá ser considerada com o objetivo de maximizar a eficiência global do processo. Posteriormente, numa perspectiva industrial, será essencial avaliar a escalabilidade e a reprodutibilidade do processo otimizado.

Adicionalmente, a exploração de colunas com ligandos mais hidrofóbicos na etapa de captura poderá revelar-se vantajosa, contribuindo para um aumento da seletividade e para a minimização de co-eluições indesejadas. Relativamente à separação de isoformas, a integração da HIC com outras técnicas cromatográficas, como a AEX ou a AC, poderá constituir uma abordagem promissora, permitindo o desenvolvimento de processos contínuos com maior rendimento e pureza.

Em conjunto, estas estratégias poderão conduzir ao estabelecimento de um processo de purificação mais robusto, seletivo e economicamente viável, em conformidade com os requisitos regulamentares para a produção de DNA de grau terapêutico e alinhado com os avanços tecnológicos emergentes na área das vacinas e terapias génicas baseadas em pDNA e mcDNA.

Referências bibliográficas

- [1] Volkova L V., Pashov AI, Omelchuk NN. Cervical Carcinoma: Oncobiology and Biomarkers. *Int J Mol Sci* 2021;22:12571. <https://doi.org/10.3390/ijms222212571>.
- [2] Zhang S, Xu H, Zhang L, Qiao Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chinese Journal of Cancer Research* 2020;32:720–8. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05>.
- [3] Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, Goldstein AT. Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future. *Sex Med Rev* 2020;8:28–37. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2019.09.005>.
- [4] Iarc. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2022 2025.
- [5] Bhattacharjee R, Das SS, Biswal SS, Nath A, Das D, Basu A, et al. Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2022;174:103675. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103675>.
- [6] Olusola P, Banerjee HN, Philley J V., Dasgupta S. Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells* 2019;8:622. <https://doi.org/10.3390/cells8060622>.
- [7] Kusakabe M, Taguchi A, Sone K, Mori M, Osuga Y. Carcinogenesis and management of human papillomavirus-associated cervical cancer. *Int J Clin Oncol* 2023;28:965–74. <https://doi.org/10.1007/s10147-023-02337-7>.
- [8] Jain M, Yadav D, Jarouliya U, Chavda V, Yadav AK, Chaurasia B, et al. Epidemiology, Molecular Pathogenesis, Immuno-Pathogenesis, Immune Escape Mechanisms and Vaccine Evaluation for HPV-Associated Carcinogenesis. *Pathogens* 2023;12:1380. <https://doi.org/10.3390/pathogens12121380>.
- [9] Molina MA, Steenbergen RDM, Pumpe A, Kenyon AN, Melchers WJG. HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. *Trends Mol Med* 2024;30:890–902. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2024.05.009>.
- [10] Nelson CW, Mirabello L. Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity. *Tumour Virus Res* 2023;15:200258. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2023.200258>.
- [11] Ye J, Zheng L, He Y, Qi X. Human papillomavirus associated cervical lesion: pathogenesis and therapeutic interventions. *MedComm (Beijing)* 2023;4. <https://doi.org/10.1002/mco2.368>.
- [12] Tomaić V. Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers (Basel)* 2016;8:95. <https://doi.org/10.3390/cancers8100095>.

- [13] Yeo-Teh NSL, Ito Y, Jha S. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *Int J Mol Sci* 2018;19:1706. <https://doi.org/10.3390/ijms19061706>.
- [14] Wang X, Huang X, Zhang Y. Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. *Front Microbiol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02896>.
- [15] Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda G-A, Zhou Y, et al. Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Front Public Health* 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.552028>.
- [16] Cospier PF, Bradley S, Luo Q, Kimple RJ. Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression. *Semin Radiat Oncol* 2021;31:265–73. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2021.02.006>.
- [17] Vats A, Trejo-Cerro O, Thomas M, Banks L. Human papillomavirus E6 and E7: What remains? *Tumour Virus Res* 2021;11:200213. <https://doi.org/10.1016/j.tvr.2021.200213>.
- [18] Pal A, Kundu R. Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front Microbiol* 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03116>.
- [19] Yim E-K, Park J-S. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 2005;37:319. <https://doi.org/10.4143/crt.2005.37.6.319>.
- [20] Anna Szymonowicz K, Chen J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer Biol Med* 2020;17:864–78. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370>.
- [21] Aggarwal S, Agarwal P, Singh AK. Human papilloma virus vaccines: A comprehensive narrative review. *Cancer Treat Res Commun* 2023;37:100780. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2023.100780>.
- [22] Williamson A-L. Recent Developments in Human Papillomavirus (HPV) Vaccinology. *Viruses* 2023;15:1440. <https://doi.org/10.3390/v15071440>.
- [23] Yang A, Farmer E, Wu TC, Hung C-F. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. *J Biomed Sci* 2016;23:75. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0293-9>.
- [24] Illah O, Olaitan A. Updates on HPV Vaccination. *Diagnostics* 2023;13:243. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13020243>.
- [25] Huh WK, Roden RBS. The future of vaccines for cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008;109:S48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.01.004>.

- [26] Linden R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estudos Avançados* 2010;24:31–69. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300004>.
- [27] Verma IM, Somia N. Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* 1997;389:239–42. <https://doi.org/10.1038/38410>.
- [28] Kaufmann KB, Büning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* 2013;5:1642–61. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202287>.
- [29] Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 2005;11:RA110-21.
- [30] Ginn SL, Mandwie M, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2023—an update. *J Gene Med* 2024;26. <https://doi.org/10.1002/jgm.3721>.
- [31] Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 2015;526:351–60. <https://doi.org/10.1038/nature15818>.
- [32] Gary EN, Weiner DB. DNA vaccines: prime time is now. *Curr Opin Immunol* 2020;65:21–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.01.006>.
- [33] Koide Y, Nagata T, Yoshida A, Uchijima M. DNA Vaccines. *The Japanese Journal of Pharmacology* 2000;83:167–74. <https://doi.org/10.1254/jjp.83.167>.
- [34] Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA Vaccines: Progress and Challenges. *The Journal of Immunology* 2005;175:633–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.2.633>.
- [35] Khan KH. DNA vaccines: roles against diseases. *Germs* 2013;3:26–35. <https://doi.org/10.11599/germs.2013.1034>.
- [36] Pagliari S, Dema B, Sanchez-Martinez A, Montalvo Zuribia-Flores G, Rollier CS. DNA Vaccines: History, Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *J Mol Biol* 2023;435:168297. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168297>.
- [37] Wang C, Pan C, Yong H, Wang F, Bo T, Zhao Y, et al. Emerging non-viral vectors for gene delivery. *J Nanobiotechnology* 2023;21:272. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02044-5>.
- [38] Sung Y, Kim S. Recent advances in the development of gene delivery systems. *Biomater Res* 2019;23. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0156-z>.
- [39] Ratko TA, Cummings JP, Blebea J, Matuszewski KA. Clinical gene therapy for nonmalignant disease. *Am J Med* 2003;115:560–9. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(03\)00447-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(03)00447-9).
- [40] Patil S, Gao Y-G, Lin X, Li Y, Dang K, Tian Y, et al. The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *Int J Mol Sci* 2019;20:5491. <https://doi.org/10.3390/ijms20215491>.

- [41] Gao X, Kim K-S, Liu D. Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *AAPS J* 2007;9:E92–104. <https://doi.org/10.1208/aapsj0901009>.
- [42] Ramamoorth M. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2015;9:GE01–6. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>.
- [43] Abdulrahman A, Ghanem A. Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review. *Anal Chim Acta* 2018;1025:41–57. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.001>.
- [44] Ferreira GNM, Monteiro GA, Prazeres DMF, Cabral JMS. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol* 2000;18:380–8. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01475-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01475-X).
- [45] Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DMF. Chromatography of plasmid DNA. *J Chromatogr A* 2005;1069:3–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.050>.
- [46] Ferreira PL, Marie H, Berger T, Edelmann B, Rammo O, Sousa F. Evaluation of novel chromatographic prototypes for supercoiled plasmid DNA polishing. *Front Bioeng Biotechnol* 2024;11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1296444>.
- [47] Urthaler J, Buchinger W, Necina R. Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta Biochim Pol* 2005;52:703–11.
- [48] Rodriguez EL, Poddar S, Iftekhhar S, Suh K, Woolfork AG, Ovbude S, et al. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *Journal of Chromatography B* 2020;1157:122332. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>.
- [49] Alves CPA, Prazeres DMF, Monteiro GA. Minicircle Biopharmaceuticals—An Overview of Purification Strategies. *Frontiers in Chemical Engineering* 2021;2. <https://doi.org/10.3389/fceng.2020.612594>.
- [50] D’Atri V, Imiolek M, Quinn C, Finny A, Lauber M, Fekete S, et al. Size exclusion chromatography of biopharmaceutical products: From current practices for proteins to emerging trends for viral vectors, nucleic acids and lipid nanoparticles. *J Chromatogr A* 2024;1722:464862. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464862>.
- [51] Freitas SS, Santos JAL, Prazeres DMF. Plasmid purification by hydrophobic interaction chromatography using sodium citrate in the mobile phase. *Sep Purif Technol* 2009;65:95–104. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.04.001>.
- [52] Mahn A. Hydrophobic Interaction Chromatography: Fundamentals and Applications in Biomedical Engineering. *Biomedical Science, Engineering and Technology, InTech*; 2012. <https://doi.org/10.5772/18045>.

- [53] Diogo MM, Queiroz JA, Monteiro GA, Martins SAM, Ferreira GNM, Prazeres DMF. Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol Bioeng* 2000;68:576–83. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000605\)68:5<576::AID-BIT13>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000605)68:5<576::AID-BIT13>3.0.CO;2-5).
- [54] Diogo MM, Ribeiro S, Queiroz JA, Monteiro GA, Perrin P, Tordo N, et al. Scale-up of hydrophobic interaction chromatography for the purification of a DNA vaccine against rabies. *Biotechnol Lett* 2000;22:1397–400. <https://doi.org/10.1023/A:1005665003375>.
- [55] Bo H, Wang J, Chen Q, Shen H, Wu F, Shao H, et al. Using a single hydrophobic-interaction chromatography to purify pharmaceutical-grade supercoiled plasmid DNA from other isoforms. *Pharm Biol* 2013;51:42–8. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.703678>.
- [56] Božič K, Sedlar A, Kralj Š, Černigoj U, Štrancar A, Sekirnik R. Selective hydrophobic interaction chromatography for high purity of supercoiled DNA plasmids. *Biotechnol Bioeng* 2024;121:1739–49. <https://doi.org/10.1002/bit.28667>.
- [57] Mayrhofer P, Blaesen M, Schleef M, Jechlinger W. Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein–DNA interaction chromatography. *J Gene Med* 2008;10:1253–69. <https://doi.org/10.1002/jgm.1243>.
- [58] Ventura C, Eusébio D, Gonçalves AM, Barroca-Ferreira J, Costa D, Cui Z, et al. Maximization of the Minicircle DNA Vaccine Production Expressing SARS-CoV-2 RBD. *Biomedicines* 2022;10:990. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050990>.
- [59] Almeida AM, Queiroz JA, Sousa F, Sousa Â. Minicircle DNA: The Future for DNA-Based Vectors? *Trends Biotechnol* 2020;38:1047–51. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.04.008>.
- [60] Gaspar V, Melo-Diogo D de, Costa E, Moreira A, Queiroz J, Pichon C, et al. Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15:353–79. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.996544>.
- [61] Almeida AM, Queiroz JA, Sousa F, Sousa A. Minicircle DNA purification: Performance of chromatographic monoliths bearing lysine and cadaverine ligands. *Journal of Chromatography B* 2019;1118–1119:7–16. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.024>.
- [62] Alves C. Development of a method for the purification of minicircles. *Dissertação de Mestrado* 2014; Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa,.

- [63] Štumpf S, Hostnik G, Primožič M, Leitgeb M, Bren U. Generation Times of *E. coli* Prolong with Increasing Tannin Concentration while the Lag Phase Extends Exponentially. *Plants* 2020;9:1680. <https://doi.org/10.3390/plants9121680>.
- [64] Trivedi RN, Akhtar P, Meade J, Bartlow P, Ataa MM, Khan SA, et al. High-Level Production of Plasmid DNA by *Escherichia coli* DH5 α Ω sacB by Introducing inc Mutations. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:7154–60. <https://doi.org/10.1128/AEM.02445-14>.
- [65] Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DMF. Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2003;998:109–17. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00618-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00618-6).
- [66] Cardoso S, Černigoj U, Lendero Krajnc N, Štrancar A. Chromatographic purification of plasmid DNA on hydrophobic methacrylate monolithic supports. *Sep Purif Technol* 2015;147:139–46. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.04.018>.
- [67] Fogg JM, Judge AK, Stricker E, Chan HL, Zechiedrich L. Supercoiling and looping promote DNA base accessibility and coordination among distant sites. *Nat Commun* 2021;12:5683. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25936-2>.
- [68] Golshan-Shirazi S, Guiochon G. Theoretical explanation of the displacement and tag-along effects. *Chromatographia* 1990;30:613–7. <https://doi.org/10.1007/BF02269733>.
- [69] Galeotti N, Hackemann E, Jirasek F, Hasse H. Prediction of the elution profiles of proteins in mixed salt systems in hydrophobic interaction chromatography. *Sep Purif Technol* 2020;233:116006. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116006>.
- [70] Senczuk AM, Klinke R, Arakawa T, Vedantham G, Yigzaw Y. Hydrophobic interaction chromatography in dual salt system increases protein binding capacity. *Biotechnol Bioeng* 2009;103:930–5. <https://doi.org/10.1002/bit.22313>.
- [71] Samanidou VF. *Basic LC Method Development and Optimization*. Analytical Separation Science, Wiley; 2015, p. 25–42. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep002>.