

Aplicação de membranas para clarificação e/ou purificação de um vetor de DNA minicircular

Daniela Maria Domingos de Carvalho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Ângela Maria Almeida de Sousa

Co-orientadores: Doutora Joana Filipa Abreu Pereira Valente

Professor Doutor Nuno Manuel Fernandes Alves

Covilhã, janeiro de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Daniela Maria Domingos de Carvalho, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição m10824 de/o Biotecnologia 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 31 / 01 / 2023

Daniela Carvalho

Agradecimentos

Em primeiro lugar não podia deixar de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Ângela Sousa, por todo o conhecimento científico que partilhou comigo e por todo o apoio e dedicação que teve ao longo do trabalho. Aos meus co-orientadores, Doutora Joana Valente e Professor Doutor Nuno Alves por me terem proporcionado a realização de todo este projeto e pela orientação dada.

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

A todos os meus colegas de laboratório, por sempre estarem disponíveis para ajudar e por terem partilhado comigo todo o vosso conhecimento. Um agradecimento muito especial à Diana Pereira, pelo privilégio que foi partilhar contigo todo o tempo em que estive no laboratório e fora dele. Muito obrigado pela ajuda incondicional em tudo o que precisei, pelas longas conversas, por todas as gargalhadas, sem ti não tinha sido a mesma coisa! Levo-te com um carinho especial no coração!

Às amigas que a universidade me deu, Carolina, Babi e Margarida, foi um gosto partilhar estes anos convosco! Obrigado por todos os momentos que passámos e que sei que não acabam por aqui, gosto muito de vocês! Aos amigos de casa, que tornavam sempre as coisas mais leves. Em particular, à que nunca ficou longe de mim, a ti Mariana obrigado por tudo!!

Um muito obrigado aos meus pais por todo o apoio e compreensão, por fazerem tudo o que podiam por mim e por nunca me falharem com nada, nem em momento nenhum. Obrigado por acreditarem sempre em mim. Às minhas irmãs, por nunca deixarem que a minha vida fosse calma, no fundo se não fosse assim, não tinha graça. Ainda aos meus avós, por estarem sempre presentes e pela confiança que sempre demonstraram ter em mim.

Por fim, a ti João, por seres o meu melhor amigo. Por saberes que as minhas demonstrações de carinho são sempre mais frias que as tuas, mas que no fundo és a melhor pessoa que podia ter ao meu lado. Obrigado por nunca me deixares desistir, obrigado por estares comigo nos bons e maus momentos, obrigado por tudo!

Resumo

O cancro do colo do útero é um dos cancros mais prevalentes em mulheres em todo o mundo. Este tipo de cancro é causado pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV), nomeadamente pelos seus genótipos de alto risco mais virulentos, o HPV-16 e o HPV-18. Após uma infeção persistente, as oncoproteínas E6 e E7 expressas por esses vírus são responsáveis pela inibição e degradação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRB, respetivamente.

A terapia génica tem sido explorada nos últimos anos devido ao seu potencial no tratamento de doenças adquiridas e incuráveis. Esta abordagem terapêutica baseia-se na entrega de uma sequência específica de DNA exógeno a uma célula hospedeira, para alterar a função de uma determinada molécula que pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de uma doença. O DNA minicircular (mcDNA) tornou-se um vetor de DNA não viral promissor, porque carece de sequências procarióticas consideradas prejudiciais (como genes de resistência a antibióticos, origem de replicação e motivos CpG, geralmente associados a questões de segurança) e, porque é um vetor de menor dimensão quando comparado com o DNA plasmídico convencional (pDNA), apresentando assim melhor eficiência de transfeção, permanência celular e expressão génica. Adicionalmente, os micro RNAs foram identificados como silenciadores de genes que degradam ou inativam um RNA mensageiro específico. Particularmente, foi comprovado que o micro-RNA-375 (miR-375) silencia a expressão das oncoproteínas E6 e E7 em células infetadas por HPV de alto risco.

Assim, o presente trabalho visa a produção e purificação de um vetor de mcDNA que codifica o gene pri-miR-375, que futuramente poderá ser utilizado para terapia génica contra o cancro do colo do útero. No entanto, o processo biotecnológico para obtenção de mcDNA envolve várias etapas (nomeadamente centrifugações; concentração com solventes orgânicos; clarificação com altas concentrações de sal; métodos de purificação que consistem em cromatografia de exclusão molecular ou cromatografia de afinidade que são demorados ou não estão disponíveis comercialmente, respetivamente) que tornam o processo *downstream* bastante caro do ponto de vista da indústria farmacêutica, mostrando assim a necessidade do desenvolvimento de estratégias alternativas.

Neste sentido, a presente dissertação sugere uma nova abordagem de recuperação do mcDNA, baseada no tratamento de lisado bruto com terra diatomácea para filtração direta e remoção de todos os detritos celulares e impurezas precipitadas, combinada com

uma segunda etapa usando uma membrana cromatográfica Sartobind® para purificar o DNA eliminando o RNA. Esta abordagem permite a substituição de várias etapas pré-estabelecidas para a preparação do lisado, nomeadamente a centrifugação dos restos celulares no final da lise alcalina, a etapa de concentração com isopropanol (e respetiva centrifugação) e a etapa de clarificação com sulfato de amónio (e respetiva centrifugação) poupando deste modo recursos, muito tempo ao processo global e, diminuindo o impacto ambiental. Na etapa de purificação, foi explorada a cromatografia de troca aniónica usando duas membranas, a Sartobind® Q75 e a Sartobind® D75. Após alguns estudos preliminares das condições de equilíbrio e eluição, foi otimizada a eliminação de grande quantidade de RNA diretamente no *flowthrough*, depois do carregamento da amostra de lisado simplificado, e o restante RNA foi eliminado durante um gradiente crescente de NaCl. A eficiência de ambas as etapas deste processo combinado foi comprovada através da quantificação das amostras recuperadas no final de cada etapa, usando uma coluna analítica CIMac™ pDNA e por fim a densidade de bandas do gel de agarose.

No geral, os estudos realizados demonstraram a eficiência da estratégia combinada. Esta nova abordagem de preparação do lisado simplificada torna o processo mais rápido, passando a ser realizado em cerca de 40 min, enquanto que a abordagem convencional demora aproximadamente 180 min. Quanto à purificação do lisado, com a membrana Sartobind® Q75 foi possível obter uma recuperação quase total do DNA ($\approx 100\%$), com uma pureza superior a 99%. No entanto, ainda é necessário realizar mais alguns estudos para melhorar o isolamento e o rendimento máximo do vetor mcDNA recuperado. Assim, espera-se que esta estratégia combinada possa ser ampliada e aplicada com sucesso na indústria farmacêutica para purificar vetores de DNA de forma rápida e económica.

Palavras-chave

Cancro do colo do útero, cromatografia de troca aniónica, DNA minicircular, membranas cromatográficas, miRNA-375, terapia génica, terra diatomácea.

Abstract

Cervical cancer (CC) is one of the most prevalent cancers in women worldwide. This type of cancer is caused by the human papillomavirus (HPV), namely by its most virulent high-risk genotypes, HPV-16 and HPV-18. After a persistent infection, E6 and E7 oncoproteins expressed by this virus are responsible for the inhibition and degradation of p53 and pRB tumor suppressor proteins.

Gene therapy has been explored in last years due to its potential in the treatment of acquired and incurable diseases. This therapeutic approach is based on delivering a specific exogenous DNA to a host cell, to change the function of a particular molecule that may play an important role in the development of a disease. Minicircular DNA (mcDNA) has become a promising non-viral DNA vector, because it lacks prokaryotic sequences, which are considered harmful (such as antibiotic resistance genes, replication origin, and CpG motifs that are generally associated with safety issues) and, because it is a small dimension vector when compared with the conventional plasmid DNA (pDNA), thus presenting better transfection efficiency, cell permanence and gene expression. Additionally, the micro RNAs have been identified as gene silencers that degrade or inactivate a specific target messenger RNA. Particularly, micro-RNA-375 (miR-375) has been proven to silence the expression of E6 and E7 oncoproteins in high-risk HPV-infected cells.

Thus, the present work aims the production and purification of a mcDNA vector that encodes the pri-miR-375 gene, which can be used for gene therapy against CC in the future. However, the biotechnological process to obtain mcDNA involves several steps (namely centrifugations; concentration with organic solvents; clarification with high salt concentrations; purification methods consisting of molecular exclusion or affinity chromatography that are time-consuming or are not available commercially, respectively) that make the downstream process quite expensive from the pharmaceutical industry's point of view, leading that the development of alternative strategies become essential.

Therefore, this Master thesis a new mcDNA recovery approach, based on the crude lysate treatment with diatomaceous earth to promote direct filtration and removal of all cell debris and precipitated impurities. Moreover, this step will be combined with a second step using a Sartobind® chromatographic membrane to purify DNA and eliminate the RNA. This approach allows the substitution of several steps pre-established for the lysate

preparation, namely the cell debris centrifugation at the end of alkaline lysis, the isopropanol concentration step and respective centrifugation, and the ammonium sulfate clarification step and respective centrifugation, saving a lot of time in the global process, resources and environmental impact. In the purification step, anion exchange chromatography was explored using two Sartobind® membranes, Sartobind® Q75 and Sartobind® D75. After some preliminary studies of equilibrium and elution conditions, it was optimized the elimination of large amount of RNA directly into the flowthrough, after loading the simplified lysate sample, and the remaining RNA was eliminated during an increasing NaCl gradient. The efficiency of both steps of this combined process was proven through the quantification of recovered samples at the end of each step, using a well-studied CIMac™ pDNA analytical column and band density of the agarose electrophoresis gel.

Overall, both studies prove the combined strategy's efficiency. This new simplified lysate preparation approach makes the process faster, starting in about 40 min, while the conventional approach takes approximately 180 min. As for the purification of lysate, with the membrane Sartobind® Q75 was possible to obtain an almost total recovery of DNA ($\approx 100\%$), with a purity greater than 99%. Although further studies are needed to improve the isolation and maximize the yield of the recovered mcDNA vector. Thus, it is expected that this combined strategy can be scaled-up and successfully applied in the pharmaceutical industry to purify the DNA vectors in a faster and more economically way.

Keywords

Anion exchange chromatography, cervical cancer, chromatographic membranes, diatomaceous earth, gene therapy, minicircle DNA, miRNA-375.

Índice

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Cancro	1
1.1.1. Cancro do colo do útero	1
1.2. Vírus do Papiloma Humano	2
1.2.1. Genoma do HPV	3
1.2.2. Ciclo de vida do HPV	5
1.2.3. Oncoproteínas E6 e E7	5
1.3. Terapia génica	7
1.3.1. Micro RNAs	10
1.3.1.1. Micro RNA-375 (miR-375)	11
1.4. DNA plasmídico (pDNA)	12
1.5. DNA minicircular (mcDNA)	13
1.5.1. Produção de DNA minicircular	14
1.5.2. Clarificação de DNA minicircular	15
1.5.3. Purificação de mcDNA	16
1.5.3.1. Cromatografia de afinidade	16
1.5.3.2. Cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel	18
1.5.3.3. Cromatografia de interação hidrofóbica	18
1.5.3.4. Cromatografia de troca iónica	19
1.6. Membranas adsorventes	21
1.6.1. Membranas de afinidade	22
1.6.2. Membranas de interação hidrofóbica	23
1.6.3. Membranas de troca iónica	23
1.7. Terra diatomácea	24
Capítulo 2 – Objetivos	27

Capítulo 3 – Materiais e métodos.....	29
3.1. Materiais.....	29
3.2. Métodos.....	29
3.2.1. Produção de mcDNA.....	29
3.2.2. Extração modificada de mcDNA.....	30
3.2.3. Clarificação de lisado com CaCl ₂	30
3.2.4. Avaliação de DNA na coluna analítica CIMac™.....	31
3.2.5. Clarificação de lisado com CaCl ₂ e DE.....	31
3.2.6. Ensaios com a membrana Sartobind® Q75.....	32
3.2.7. Ensaios com a membrana Sartobind® D75.....	32
3.2.8. Eletroforese em gel de agarose.....	33
3.2.9. Análise das amostras purificadas por densitometria de bandas.....	33
Capítulo 4 – Resultados e discussão	35
4.1. Clarificação do lisado com CaCl ₂	35
4.2. Ensaios com membrana Sartobind® Q75.....	42
4.3. Abordagem alternativa para validação do novo método.....	47
4.3.1. Extração modificada.....	47
4.3.2. Clarificação do lisado com CaCl ₂	48
4.3.3. Clarificação do lisado com CaCl ₂ e DE.....	49
4.4. Ensaios com membrana Sartobind® Q75 e membrana Sartobind® D75.....	50
4.4.1. Análise das amostras purificadas por densitometria de bandas.....	55
Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas futuras	58
Capítulo 6 – Referências.....	61
Anexo	71

Lista de Figuras

Figura 1. Taxa de incidência do cancro do colo do útero no mundo, em mulheres, no ano 2020.....	2
Figura 2. Estrutura do genoma do HPV.	4
Figura 3. Distribuição de ensaios clínicos de terapia génica, nas principais categorias de doenças.	9
Figura 4. Representação da biogénese canónica de miRNAs.	11
Figura 5. Representação esquemática da produção do vetor de DNA minicircular (mcDNA) a partir do plasmídeo parental (PP).....	14
Figura 6. Cromatografia de afinidade.	17
Figura 7. Cromatografia de exclusão molecular.	18
Figura 8. Cromatografia de interação hidrofóbica.	19
Figura 9. Cromatografia de trona iónica.....	20
Figura 10. Representação do efeito da adição da DE.	25
Figura 11. Representação esquemática do processo de filtração na clarificação do lisado com CaCl ₂ e adicionando DE. 1 – Adição de DE; 2 – Montagem do sistema de filtração; 3 – Passagem da mistura pelo filtro; 4 – Desmontagem do sistema de filtração; 5 – Armazenamento da amostra.	32
Figura 12. Influência do CaCl ₂ na remoção de impurezas. Eletroforese das amostras de lisados clarificados com diferentes concentrações de CaCl ₂ : A - 0,75M; B – 0,5M; C – 0,25M. 1 – Amostra retida no filtro; 2 – Amostra inicial/não filtrada; 3 – Amostra filtrada.	36
Figura 13. Eletroforese do lisado clarificado com 0,25M CaCl ₂ usando filtro novo de 0,22µm (Sartolab® BT 150, 0,22µm, PES). 1 – Amostra retida no filtro; 2 – Amostra inicial/não filtrada; 3 – Amostra filtrada.	37
Figura 14. Perfil cromatográfico na coluna analítica CIMac™ pDNA. Análise da amostra de lisado tratada com 0,5M de CaCl ₂	38

Figura 15. Eletroforese do lisado clarificado com 0,4M CaCl ₂ . 1 – Amostra inicial/não filtrada; 2 – Amostra filtrada com filtro de 0,45µm; 3 – Amostra filtrada com filtro de 0,45µm e 0,22µm.	39
Figura 16. Representação esquemática de comparação dos dois métodos. A – Método convencional; B – Novo método adicionando DE.	40
Figura 17. Eletroforese do lisado bruto tratado com DE. 1 – Lisado sem CaCl ₂ ; 2 – Lisado com 0,4M CaCl ₂	41
Figura 18. Perfil cromatográfico na MA Q75. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 a 5 – respectivos picos cromatográficos.....	43
Figura 19. Perfil cromatográfico na MA Q75. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 a 6 – respectivos picos cromatográficos.....	44
Figura 20. Perfil cromatográfico na MA Q75. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 a 4 – respectivos picos cromatográficos.....	45
Figura 21. Perfil cromatográfico na MA Q75. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 a 6 – respectivos picos cromatográficos.....	46
Figura 22. Perfil cromatográfico na MA Q75. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 – amostra do lisado tratada com 0,4M CaCl ₂ e DE; 2 a 6 – respectivos picos cromatográficos.....	46
Figura 23. Eletroforese das amostras de lisado. A – lisado A; B- lisado B.....	48
Figura 24. Influência do CaCl ₂ na remoção de impurezas. Eletroforese das amostras de lisados clarificados com diferentes concentrações de CaCl ₂ : A – 0,25M; B – 0,4M; C – 0,5M. 1 – Amostra inicial/não filtrada; 2 – Amostra Filtrada; 3 – Amostra Retida.	49
Figura 25. Eletroforese do lisado bruto tratado com 0,4M CaCl ₂ e DE.	49
Figura 26. Perfis cromatográficos dos ensaios na MA Q75. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 – amostra do lisado tratada com 0,4M CaCl ₂ e DE; 2 a 6 – respectivos picos cromatográficos.	52

Figura 27. Perfis cromatográficos dos ensaios na MA Q75. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 – amostra do lisado tratada com 0,4M CaCl₂ e DE; 2 a 6 – respectivos picos cromatográficos.....54

Figura 28. Eletroforese das amostras de DNA tratadas com 0,4M CaCl₂ e DE, após purificação com as membranas de cromatografia de troca aniónica. 1- Lisado bruto tratado com 0,4M CaCl₂ e DE; 2 a 4 – ensaios na MA Q75; 5 a 7 – ensaios na MA D75.55

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais funções dos genes do HPV.	4
Tabela 2. Produtos aprovados para terapia génica e respetivo tratamento.....	8
Tabela 3. Avaliação da quantidade total de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação presentes na amostra de lisado tratada com 0,5M de CaCl ₂	38
Tabela 4. Avaliação da quantidade total, percentagem de pureza e percentagem de recuperação presentes na amostra de lisado tratada com 0,4M de CaCl ₂	40
Tabela 5. Avaliação da quantidade total de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação presentes na amostra de lisado tratada com 0,4 M de CaCl ₂ e DE	41
Tabela 6. Avaliação da quantidade total de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação na amostra de lisado tratada com 0,4 M de CaCl ₂ e DE.....	47
Tabela 7. Avaliação da concentração de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação nas amostras das etapas da extração modificada	48
Tabela 8. Avaliação da concentração de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação na amostra de lisado tratada com 0,4 M de CaCl ₂ e DE.....	50
Tabela 9. Cálculo da pureza do DNA da amostra de lisado tratada com 0,4 M de CaCl ₂ e DE, e cálculo da pureza e rendimento das amostras purificadas nas membranas MA Q75 e MA D75 (cromatogramas da Figura 26 e 27), através do software Image J.	56

Lista de Acrónimos

CC	<i>Cervical cancer</i>
CCU	Cancro do colo do útero
CIN	Neoplasia Intraepitelial Cervical (“ <i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i> ”)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DE	Terra Diatomácea (“ <i>Diatomaceous Earth</i> ”)
DO _{600nm}	Densidade ótica a 600nm
E2F	Fator de transcrição
E6AP	Proteína associada a E6 (“ <i>E6 Associated Protein</i> ”)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
gDNA	DNA genómico
GOI	Gene de Interesse (“ <i>Gene of Interest</i> ”)
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de alto grau (“ <i>High grade SIL</i> ”)
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de baixo grau (“ <i>Low grade SIL</i> ”)
mcDNA	DNA minicircular
miRNA	MicroRNA
mP	Mini-plasmídeo
ncRNA	RNAs não codificadores
oc	Circular aberta
OMS	Organização Mundial de Saúde
oncomiRs	miRNAs oncogénicos
ORI	Origem de Replicação
pDNA	DNA plasmídico
PEG	Poli(etil)enoglicol
PP	Plasmídeo Parental
pré-miRNA	MicroRNA precursor
pri-miRNA	MicroRNA primário
RISC	Complexo silenciador induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
sc	Superenrolada
SIL	Lesão Intraepitelial Escamosa (“ <i>Squamous Intraepithelial Lesion</i> ”)

TB	<i>Terrific Broth</i>
tsmirRs	miRNAs supressores de tumor
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta

Lista de Publicações Científicas

D. Carvalho, D. Pereira, N. Alves, A. Pickl, S. Cardoso, J.F.A. Valente, A. Sousa (2022) New Combined Approach to Simplify the Minicircular DNA Lysate and Directly Apply in Ion Exchange Membrane Chromatography. *Materials Proceedings*. 8: 41. DOI: 10.3390/materproc2022008041 <https://doi.org/10.3390/materproc2022008041>

Lista de Comunicações Científicas

Comunicação em forma de poster no “*MATERIAIS 2022, XX Congresso da Sociedade Portuguesa de Materiais, XI Simpósio Internacional de Materiais e o II Encontro Ibérico de Ciências dos Materiais*” – Centre for Rapid and Sustainable Product Development, Politécnico de Leiria, Marinha Grande (2022): Daniela Carvalho, Diana Pereira, Nuno Alves, Andreas Pickl, Sara Cardoso, Joana Valente, Ângela Sousa. New Combined Approach to Simplify the Minicircular DNA Lysate and Directly Apply in Ion Exchange Membrane Chromatography. (Anexo)

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Cancro

O cancro é uma doença que provoca alterações fisiopatológicas inerentes ao processo de divisão celular e, tem um enorme destaque como um importante distúrbio responsável por um grande número de mortes em todo o mundo [1]. Atualmente, o cancro é considerado a principal causa de morte da humanidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as últimas estimativas feitas referem cerca de 19,3 milhões de novos casos e quase 10 milhões de mortes por cancro no ano de 2020 [2]. De ano para ano, a carga de incidência e a mortalidade associada ao cancro tem vindo a crescer rapidamente devido essencialmente a fatores como o crescimento e envelhecimento populacional, mudanças sociais, económicas e estilo de vida [3]. Tendo em conta estes fatores estima-se que em 2040 haja um aumento de cerca de 47% de casos em relação a 2020 o que corresponderá a cerca de 28,4 milhões de casos de cancro [2].

1.1.1. Cancro do colo do útero

O cancro do colo do útero ou cancro cervical é, atualmente, o quarto cancro diagnosticado com mais frequência e a quarta principal causa de morte entre as mulheres. No ano de 2020, teve uma incidência de cerca de 604 mil novos casos (Figura 1), sendo responsável por 342 mil mortes no mundo [2]. A disparidade de casos entre mulheres com cancro do colo do útero em países desenvolvidos e mulheres que vivem em locais com poucos recursos é cada vez mais evidente. Por exemplo regiões como África Subsariana e América do Sul veem as taxas de incidência a aumentar, enquanto que em países da Europa, mais desenvolvidos e considerados de altos rendimentos, as taxas estão a diminuir rapidamente prevendo-se a possível eliminação do cancro do colo do útero nas próximas décadas nestas zonas do mundo [4]. Numericamente, em cada dez mulheres que morrem devido a este cancro, nove delas vivem em países de médios e baixos rendimentos. Este contraste deve-se essencialmente às medidas de rastreamento e prevenção da doença e aos programas de vacinação existentes nos países desenvolvidos e que são praticamente inexistentes ou inacessíveis em países menos desenvolvidos [4,5].

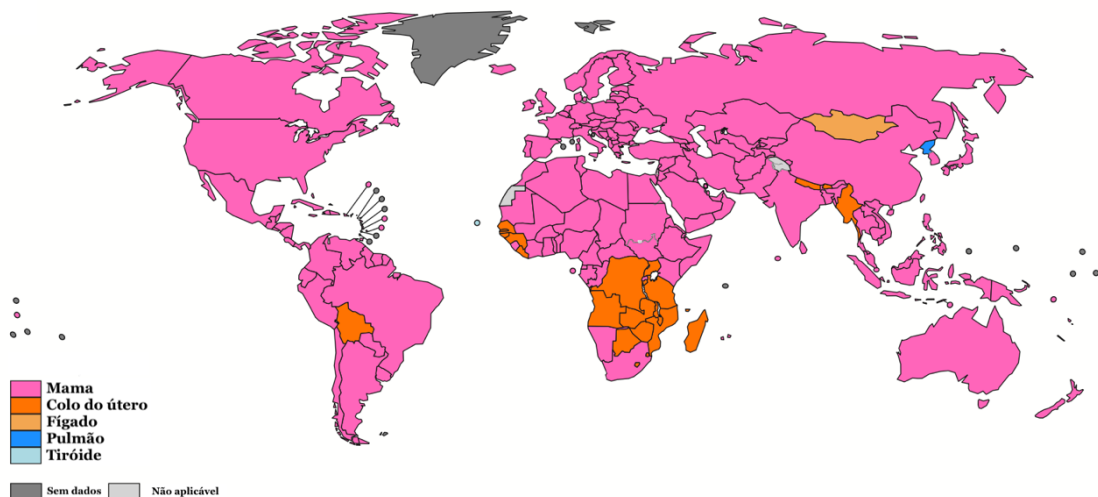


Figura 1. Taxa de incidência do cancro do colo do útero no mundo, em mulheres, no ano 2020. Adaptado de [2].

1.2. Vírus do Papiloma Humano

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é o principal fator associado ao desenvolvimento do cancro do colo do útero. Este vírus, de entre todas as neoplasias malignas relacionadas ao HPV, é a causa mais importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo, estando associado a cerca de 99,7% de todos os casos de cancro do colo do útero [6,7].

Até à data, já foram reconhecidos cerca de 200 genótipos de HPV, mas apenas alguns estão relacionados com infeções que podem persistir e progredir para cancro cervical. Os outros genótipos estão relacionados com os cancros como orofaríngeo, vulvar, vaginal e peniano [8]. Visto ser um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento de cancro do colo do útero, é necessário compreender a constituição e atuação do HPV para que se possam desenvolver estratégias adequadas à sua prevenção.

Sendo assim, o HPV pertencente à família *Papillomaviridae*, pode ser classificado em cinco géneros: alfa, beta, gama, mu e nu. Enquanto os restantes géneros infetam locais a nível cutâneo, podendo ser eliminados por uma resposta imune ao longo do tempo, os tipos de HPV do género alfa infetam principalmente as superfícies mucocutâneas anogenitais, em que alguns deles podem conter vírus com potencial oncogénico [9]. Dependendo do potencial cancerígeno, os tipos alfa-HPV são ainda divididos como de baixo risco (podem causar verrugas anogenitais ou até ser assintomáticos) e de alto risco (oncogénicos). De entre os tipos de alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59), encontram-se o HPV-16 e o HPV-18, que estão associados a cerca de 70% dos casos existentes, sendo o HPV-16 considerado o tipo mais oncogénico [5,10].

O HPV é um vírus que pode ser transmitido sexualmente. O momento em que uma mulher apresenta maior risco de infecção por HPV corresponde ao período de maior atividade metaplásica (na região entre o epitélio escamoso da ectocérvice e o epitélio colunar da endocérvice), que ocorre na puberdade e após a primeira gravidez. Assim, um início precoce da atividade sexual aumenta o risco de infecção por HPV, podendo ainda estar associado a outras infecções sexualmente transmissíveis [5,6].

A infecção por HPV é considerada transitória pois, é normalmente eliminada ao longo do tempo pelo sistema imunológico, não levando ao aparecimento de cancro [11]. Cerca de 90% das lesões pré-cancerígenas regridem espontaneamente ou são mesmo eliminadas em 12 a 36 meses [6]. Por outro lado, se ocorrerem alterações no genoma viral e/ou na célula hospedeira durante vários anos, a infecção transitória pode tornar-se persistente e, se o sistema imunológico não for capaz de a detetar e até mesmo eliminar pode progredir para cancro [11].

A doença cervical que precede o cancro cervical resultante da infecção por HPV, é uma doença bastante comum. Esta pode ser detetada através da realização do exame do Papanicolau, onde se faz a raspagem de células da superfície do colo do útero para serem examinadas ao microscópio de maneira a serem identificadas. A doença cervical pode ser classificada por um sistema de três estágios, chamado “neoplasia intraepitelial cervical” (CIN – “*Cervical Intraepithelial Neoplasia*”) ou por um sistema de apenas dois estágios, denominado “lesão intraepitelial escamosa” (SIL – “*Squamous Intraepithelial Lesion*”). A lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL – “*Low grade SIL*”), corresponde ao CIN1 e é considerada a infecção transitória do HPV, tendo uma baixa progressão para cancro cervical. No caso de lesão intraepitelial escamosas de alto grau (HSIL – “*High grade SIL*”), correspondente aos CIN2 e CIN3, na maior parte dos casos já representam uma infecção persistente. Podemos dizer então, que estamos na presença de uma doença pré-cancerosa. Com um pouco menos de casos comparativamente à CIN1, mas cerca de 60% também regridem espontaneamente. Pode haver uma progressão de CIN1 para CIN3 [6,11].

1.2.1. Genoma do HPV

O genoma do HPV (representado na Figura 2) é constituído por uma dupla cadeia de DNA, composta por aproximadamente 8000 pares de bases. Apresenta uma estrutura icosaédrica, sem envelope, de cerca de 60 nm de diâmetro. O seu genoma contém oito quadros de leitura abertos (ORFs – “*Open Reading Frames*”), divididos em três regiões distintas: região precoce ou inicial (E – “*Early*”), região tardia (L – “*Late*”) e a região de controlo longa (LCR – “*Long Control Region*”) [12].

A região denominada precoce (4000pb) compreende seis proteínas iniciais, em que três delas são proteínas reguladoras (E1, E2 e E4) e as restantes são oncoproteínas (E5, E6 e E7). As oncoproteínas são responsáveis pela replicação viral e transformação da célula infetada, estando as suas funções especificadas na Tabela 1. A região tardia, é composta por 3000pb e codifica duas proteínas estruturais, L1 e L2, que constituem o capsídeo do vírus (L1 é o principal componente do capsídeo e L2 o componente secundário). Por último, a LCR controla a replicação do DNA viral (contem a origem da replicação) e os elementos reguladores da transcrição (constituída por cerca de 1000pb) [12,13].

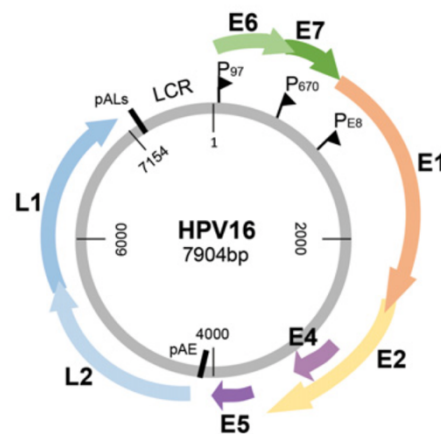


Figura 2. Estrutura do genoma do HPV. Adaptado de [11].

Tabela 1. Principais funções dos genes do HPV. Adaptado de [7,10].

Gene	Principal função
E1	Controla a replicação viral
E2	Regula a replicação do DNA viral
E4	Pode mediar a liberação de partículas virais desestabilizando a rede de citoqueratinas
E5	Interage com fatores de crescimento
E6	Oncoproteína que interage com a proteína p53
E7	Oncoproteína que interage com a proteína pRb
L1	Proteína de cápside maior
L2	Proteína de cápside menor

1.2.2. Ciclo de vida do HPV

A infecção por HPV acontece através de uma microferida, em que as células basais em proliferação do epitélio estratificado exposto são infetadas. Esta infecção inicial torna o promotor inicial ativo, resultando na expressão da helicase viral E1, que juntamente com E2, facilita o estabelecimento da replicação viral: os genomas virais são estabelecidos no núcleo das células infetadas como epissomas que são rapidamente amplificados para 50-100 cópias por células. Nesta fase, os epissomas são mantidos em baixo número de cópias nos queratinócitos basais em divisão ativa, juntamente com o DNA celular. À medida que as células basais infetadas se dividem, o DNA viral é dividido em células filhas (uma célula permanece na camada basal, mas a outra célula migra para longe), iniciando a diferenciação epitelial. A diferenciação dá início à fase produtiva do ciclo de vida viral, levando à ativação do promotor tardio, expressão dos genes virais tardios (E4, E5, L1 e L2) e a elevados níveis de E1 e E2 que conduzem à amplificação do genoma viral para milhares de cópias por célula. A libertação do vírus mantém-se restrita à camada superior do epitélio, graças às proteínas estruturais que constituem o capsídeo, que são expressas apenas em células suprabasais, altamente diferenciadas. Nesta fase, as proteínas E6 e E7 atuam desregulando os pontos de verificação do ciclo celular normal, fazendo com que as células epiteliais normais que tendem a sair do ciclo celular, voltem para um ambiente G2 que fornece fatores celulares necessários para a replicação viral reprodutiva. Como vai ser descrito detalhadamente mais à frente, as proteínas E6 e E7 desregulam a proliferação celular e tem como alvo as proteínas supressoras de tumor p53 e pRB, respetivamente [14].

1.2.3. Oncoproteínas E6 e E7

As oncoproteínas E6 e E7 do HPV são pequenas proteínas de 150 e 100 aminoácidos, respetivamente, que apesar de não lhes ser conhecida atividade enzimática têm a capacidade de manipular a atividade da célula hospedeira ao ligarem-se a proteínas celulares formando complexos celulares [6,15]. Estas oncoproteínas tem extrema importância na carcinogénese ligada ao HPV, devido à sua capacidade de inativação das vias supressoras de tumor [15]. A proteína E6 liga-se à proteína supressora de tumor p53, enquanto a E7 se liga à proteína supressora de tumor do retinoblastoma (pRb). Em ambos os casos, as oncoproteínas levam à degradação das proteínas supressoras de tumor, causando a proliferação celular descontrolada, transformação e formação de tumor [5].

A oncoproteína E6 pode induzir a degradação da p53, dificultando a sua função como regulador da cascata de sinalização da apoptose. Através da ligação à proteína E6AP (ubiquitina ligase), ocorre uma alteração estrutural na E6, o que permite a sua ligação à

proteína p53, formando um complexo trimérico E6/E6AP/p53. Esta ligação pode prejudicar a ativação transcricional ou repressão de promotores responsivos à p53, impedindo assim a sua ligação a motivos específicos de DNA e levando à degradação por ubiquitinação da p53. Com a inativação da função da p53, ocorre o favorecimento da replicação contínua do DNA danificado e a sobrevivência celular anormal (proliferação celular), que de outra forma poderia ser reparada ou eliminada pela indução da apoptose quando a p53 é expressa em níveis normais [6,16].

A pRb, é a proteína responsável por regular negativamente o fator de transcrição E2F. Quando a oncoproteína E7 está presente, liga-se à pRb causando a sua inativação e degradação. Consequentemente, a pRb perde a capacidade de regular o fator E2F, passando este a ativar e libertar os genes alvo E2F promotores da proliferação celular [6].

A ação destas duas oncoproteínas é potenciada com a sua conjugação. A oncoproteína E7, quando atua sozinha, apesar de levar à contínua proliferação celular por inativar a pRb (e outros fatores), pode ser neutralizada quando a p53 induz a apoptose. No entanto, com a ação conjugada de E6, a formação do complexo trimérico que degrada proteoliticamente a p53, impede que esta bloqueie a possível resposta apoptótica à oncoproteína E7 e leva ao crescimento descontrolado de células anormais [15].

Apesar das proteínas E6 e E7 serem consideradas os principais agentes causadores da transformação celular de células infetadas por HPV, também a proteína E5 apresenta atividade carcinogénica. Esta proteína interage com o fator de crescimento epidérmico (EFG), que é um estimulador de crescimento celular, o que promove o aumento da proliferação celular e uma progressão do tumor [16].

1.3. Terapia génica

Atualmente, o tratamento do cancro do colo do útero, quando em estado inicial da doença, passa por recorrer a cirurgia para se remover o tecido cancerígeno, por vezes acompanhada por quimioterapia ou radioterapia. Após a cirurgia, é comum seguir-se para a radioterapia, quando se trata de casos de cancro localizado e não metastático. No entanto, apesar de apresentar resultados satisfatórios em inúmeros casos, quando este tratamento não se mostra eficaz ou quando é necessário que o tratamento abranja todo o organismo (devido a possíveis metástases do tumor), recorre-se à quimioterapia. Este tratamento envolve a administração de substâncias citotóxicas, como por exemplo, agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos antitumorais, inibidores de topoisomerase e corticosteróides [17], que podem interferir na proliferação celular, levando à morte das células cancerígenas e impedindo o crescimento do tumor. Contudo, durante a sua atuação, estes dois tratamentos não têm a capacidade de diferenciar o tecido cancerígeno do tecido saudável. Este facto leva a uma citotoxicidade significativa que pode provocar efeitos secundários e provocar desconforto no paciente, não sendo garantido no final a eliminação total do cancro [16]. Assim, torna-se urgente e fundamental o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que sejam direcionadas, eficientes e duradoras na eliminação de células cancerígenas, tal como é exemplo a terapia génica.

A terapia génica foi originalmente concebida como uma técnica para tratar doenças relacionadas com distúrbios genéticos, e está atualmente amplificada a outras doenças como tumores cancerígenos e doenças infecciosas. Apesar de ser um conceito conhecido há várias décadas, foi desde o início da década de 1990, altura em que ocorreu o primeiro ensaio clínico, que começaram a surgir novas técnicas e uma maior compreensão sobre uma entrega de genes mais eficaz aos tecidos alvo. Apesar de todos os obstáculos, passados quase 30 anos já se encontram 16 produtos aprovados globalmente recorrendo à terapia génica (descritos na Tabela 2, com respetiva indicação da doença em que podem ser aplicados) [18]. Seis terapias génicas receberam aprovação no mundo ocidental, sendo as restantes aprovadas em países como a China, Filipinas, República da Coreia, Japão, Arábia Saudita e Turquia [18,19].

Tabela 2. Produtos aprovados para terapia gênica e respetivo tratamento. Adaptado de [18].

Produto de terapia gênica	Data de autorização	Tratamento
Gendicine®	Outubro 2023 (China)	Carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço
Oncorine®	Novembro 2005 (China)	Cancro da nasofaringe refratário em estágio avançado
Rexin-G®	Dezembro 2007 (Filipinas)	Um amplo espectro de cancros intratáveis
Neovasculgen®	Dezembro 2011 (Russia)	Doença arterial periférica, incluindo isquemia crítica do membro
Glybera®	Julho 2012 (UE)	Deficiência de lipoproteína lipase reversa
Imlygic®	Outubro 2015 (EUA)	Melanoma
Strimvelis®	Maió 2016 (UE)	Imunodeficiência combinada grave devido à deficiência de adenosina desaminase
Zalmoxis®	Agosto 2016 (UE)	Doença do enxerto versus hospedeiro
Invossa®	Julho 2017 (República da Coreia)	Osteoartrite do joelho
Kymiah®	Agosto 2017 (EUA)	Leucemia linfoblástica aguda de células B; Linfoma de Hodgkin
Yescarta®	Outubro 2017 (EUA)	Linfoma de Hodgkin
Luxturna®	Dezembro 2017 (EUA)	Amaurose congénita de Leber; Retinite pigmentosa
Onpattro®	Agosto 2018 (EUA)	Polineuropatia da amiloidose hereditária em pacientes mediados por transtirretina
Zolgensma®	Maió 2019 (EUA)	Espinhal muscular
Zynteglo®	Maió 2019 (UE)	Beta-talassemia
Givlaari®	Novembro 2019 (EUA)	Porfíria hepática aguda em adultos

A terapia génica baseia-se então no princípio da entrega de uma sequência específica de DNA exógeno a uma célula hospedeira, a fim de alterar a função de uma determinada molécula que pode desempenhar um papel importante e estar relacionado com o desenvolvimento de uma doença [20]. Mais especificamente, o objetivo da terapia génica para doenças genéticas consiste em levar à expressão do gene que é transferido em níveis elevados e a longo prazo para garantir um efeito terapêutico (sendo assim denominada de terapia génica de substituição). Esta abordagem visa restaurar uma função celular, fornecendo uma cópia funcional do gene mutado, por exemplo. Outra abordagem possível consiste na supressão do gene prejudicial, reduzindo a sua expressão via RNA de interferência. Uma terceira abordagem mais recente, que ainda não foi aplicada em ensaios clínicos, consiste em técnicas de edição do genoma para correção do gene mutado na sua localização genómica precisa, por meio de recombinação homóloga com um modelo de doador ou via adição de bases [19].

Até à data, a maioria dos ensaios clínicos de transferência de genes consiste no tratamento de doenças cancerígenas [19]. Desde o início (1988) até 2020, já foram realizados cerca de 1373 ensaios (65,2%) clínicos aplicando a terapia génica contra o cancro (Figura 3) [18].

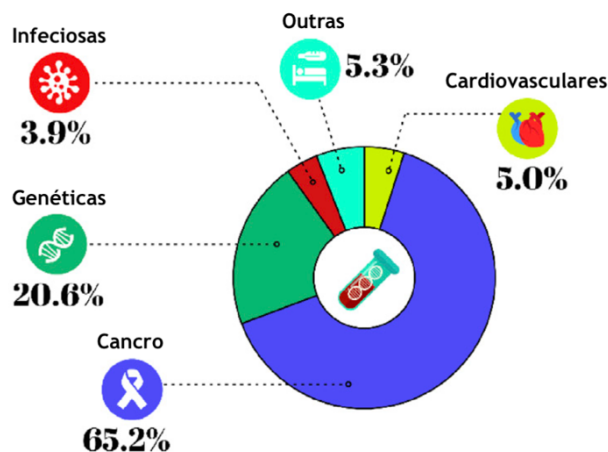


Figura 3. Distribuição de ensaios clínicos de terapia génica, nas principais categorias de doenças. Adaptado de [18].

O sucesso da terapia génica depende muito do desenvolvimento de vetores de genes seguros e de estratégias de entrega desses genes que permitem chegar diretamente às células cancerígenas, evitando assim os efeitos colaterais fora das células alvo que podem ocorrer durante o tratamento de quimioterapia por exemplo. Os sistemas de entrega utilizados para introduzir genes exógenos nas células alvo, podem ser agrupados em dois tipos: vetores virais (sendo os vírus mais usados, o retrovírus, lentovírus, Adenovírus

(Ad), vírus Adeno-associados (AAV) ou vírus herpes simples) e os vetores não virais (tais como, lipossomas, poliplexos, nanopartículas, etc). Os vetores não virais apresentam baixa imunogenicidade e elevada segurança, mas a eficiência de transfeção de células eucarióticas é menor do que os vetores virais [20,21]. Para ajudar na eficácia de alguns destes vetores, podem ser aplicados métodos de entrega físicos (microinjeção, eletroporação, sonoporação, ultrassons, entre outros) [20].

Sendo os principais efeitos tumorogénicos do HPV atribuídos à expressão dos oncogenes E6 e E7, que apenas estão presentes em células infetadas, estes tornam-se alvos ideais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Desta forma, algumas abordagens consistem em bloquear a expressão dos oncogenes e restaurar a função das proteínas supressoras de tumor. Por exemplo, através do uso de vetores de Ad recombinantes que expressam miRNAs artificiais direcionados aos transcritos de E6, é possível atingir *in vitro* o *knockdown* de E6 em células HeLa e SiHa, levando à morte celular pós apoptose pela via intrínseca [21].

1.3.1. Micro RNAs

Os micro RNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores (ncRNA) de cadeia simples (19-25 nucleótidos de comprimento), que regulam a expressão génica principalmente pela ligação a motivos de sequência localizados na região 3' não traduzida (3'-UTR) dos transcritos de mRNA [22]. Com base no seu papel na carcinogénese, podem ser classificados como miRNAs oncogénicos (oncomiRs), que são regulados positivamente em células cancerígenas e conseqüentemente suprimem a expressão de genes supressores de tumor e encadeiam a carcinogénese; ou como miRNAs supressores de tumor (tsmiRs), que são regulados negativamente nas células cancerígenas e, assim, permitem o aumento da expressão do oncogene favorecendo a malignidade [23]. Desta forma, os microRNAs desempenham assim um papel fundamental no desenvolvimento, progressão e disseminação do cancro [22]. Considerando que o genoma humano codifica centenas de miRNAs que estão associados a várias doenças, incluindo o cancro, a desregulação da expressão desses miRNAs vai influenciar fortemente a progressão dessa doença [23].

A biogénese destas moléculas inicia-se com a transcrição dos miRNAs, pela RNA polimerase II, dando origem a miRNA primário (pri-miRNA). Ainda no núcleo, uma das extremidades do pri-miRNA é clivada por um complexo microprocessador (que compreende a enzima Drosha, e outras como, a enzima RNase III, a proteína de ligação dupla de RNA e a região DGCR8) originando um miRNA precursor (pré-miRNA). O pré-miRNA é transportado para o citoplasma, por interação direta com o recetor de

exportação Exportina 5 (Exp5), onde a outra extremidade é clivada pela enzima Dicer, produzindo uma molécula de miRNA de cadeia dupla. A molécula de miRNA de cadeia dupla, através de um processo denominado carregamento do complexo silenciador induzido por RNA (RISC), é entregue a um membro da família de proteínas, a Argonaute (AGO), que seleciona uma cadeia que continua associada ao RISC, e transforma-se no miRNA maduro, descartando a outra cadeia que sofre degradação. Este complexo funcionará como inibidor da síntese de proteínas alvo (Figura 4) [24,25].

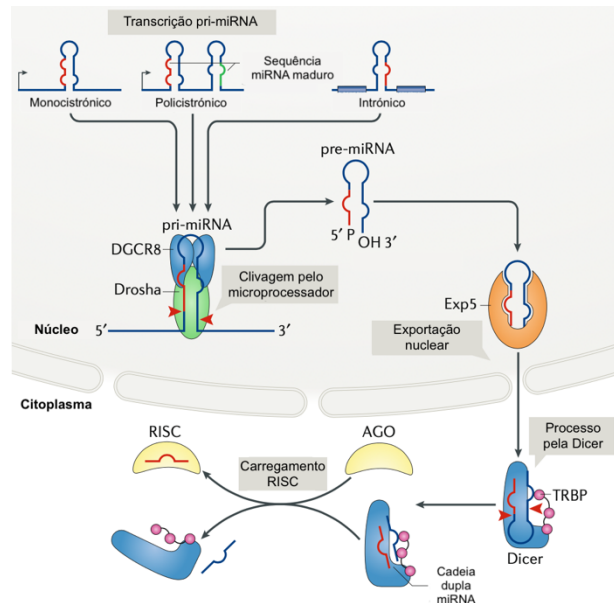


Figura 4. Representação da biogênese canônica de miRNAs. Adaptado de [24].

Uma das características do miRNA é a sua capacidade de regular moléculas e processos com funções e vias de sinalização semelhantes (pleiotropia), o que pode tornar os efeitos biológicos fora do alvo uma preocupação. No entanto, respostas inespecíficas semelhantes também ocorrem com a terapêutica tradicional que visa genes codificadores de proteínas únicas [26].

1.3.1.1. Micro RNA-375 (miR-375)

Nos últimos anos, a regulação da expressão gênica mediada por miRNAs tem-se tornado um tópico importante, devido aos seus papéis críticos no desenvolvimento do cancro. Em particular em pacientes com cancro do colo do útero, o nível de miR-375 encontra-se diminuído (regulação negativa). No entanto, se o miR-375 for regulado positivamente pode atenuar a proliferação, migração e invasão de células de carcinoma cervical, tendo um efeito semelhante aos genes supressores de tumor [27–29]. Wang e colaboradores demonstraram este comportamento num estudo, através de células SiHa e CaSki transfetadas com um miR-375 mutado, em que a superexpressão do miR-375 causou a paragem significativa do ciclo celular em G2, sugerindo que o aumento dos níveis de miR-

375 bloqueia a transição da fase G1 para a fase S e inibe consequentemente a progressão do ciclo celular nas células cancerígenas cervicais [30].

O miR-375 é um importante supressor de tumor que pode regular negativamente os transcritos de HPV-16 e 18 e suprimir as oncoproteínas E6, E7 e E6AP. Jung e colaboradores, mostraram pela primeira vez como o miRNA celular (miR-375) interage com os transcritos E6 e E7 dos HPV-16 e 18, reduzindo a sua expressão. Estes autores demonstraram através da suplementação de miR-375 em células cancerígenas positivas para HPV, que este suprime os componentes oncogénicos, assegurando o restabelecimento dos níveis de expressão dos principais supressores de tumor p53 e pRb, e regulando assim, o ciclo celular [31].

No entanto, a via que leva à diminuição do miR-375 no cancro cervical, não é clara. Noutro estudo, usando células HeLa e CaSki, observou-se que o miR-375 e a Dicer (a enzima já referida anteriormente como uma enzima crítica no processamento de pré-miRNAs em RNA maduro) estão ambos diminuídos e correlacionados positivamente, nos tecidos cervicais [32]. De facto, uma menor expressão da Dicer nos tecidos do cancro cervical está associada aos estágios de tumor e à metástase [33]. Assim, ao observar-se que a superexpressão do miR-375 também aumentou o nível de Dicer nas células, pôde-se concluir que existe uma regulação recíproca, através da TAp63 β , entre o miR-375 e a Dicer [32].

1.4. DNA plasmídico (pDNA)

Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA circular, constituídos por uma cadeia dupla e têm capacidade de se auto-replicar dentro de um hospedeiro adequado. Estas moléculas podem apresentar diferentes conformações que diferem na carga, tamanho, hidrofobicidade e na exposição das suas bases, nomeadamente a isoforma linear, circular aberta (oc) e superenrolada (sc) [34].

Considerada nos últimos anos uma biomolécula promissora e comumente usada em terapia génica, o pDNA tem sido utilizado para vários estudos a nível mundial. Devido ao risco de biossegurança associado à entrega de genes com vetores virais, o interesse e estudo dos vetores não virais tem aumentado fortemente no sentido de melhorar a sua eficiência de entrega de genes às células alvo. [35]. Desde a fácil manipulação até à sua produção de baixo custo, os investigadores consideram a molécula de pDNA muito atraente tanto para a terapia génica como para produção de vacinas de DNA [36]. No entanto, a conversão de abordagens baseadas no pDNA em produtos farmacêuticos reais

ainda é severamente prejudicada por inúmeras preocupações associadas às correlações estrutura-atividade do pDNA [37].

Os vetores plasmídicos podem ser subdivididos numa unidade transcricional que contém o gene terapêutico de interesse (GOI – “*Gene Of Interest*”) e as sequências reguladoras, e uma unidade com sequências bacterianas que incluem o gene de resistência a antibióticos, a origem de replicação (ORI) e motivos CpG. Algumas destas sequências são necessárias para a produção do pDNA dentro da célula hospedeira, mas podem causar sérios problemas de segurança biológica [35]. Nomeadamente, as sequências bacterianas e os motivos CpG, podem desencadear respostas imunes adversas quando entregues ao paciente, causando sérios problemas de biocompatibilidade. A presença de marcadores de seleção de antibióticos também é uma desvantagem adicional, uma vez que pode ocorrer a transferência de genes de resistência para a flora bacteriana humana. Além disso, o silenciamento do transgene em células eucarióticas ocorre logo após a administração do pDNA, o que é um grande obstáculo que enfatiza ainda mais as limitações associadas a esta biomolécula [37].

1.5. DNA minicircular (mcDNA)

No sentido de ultrapassar as limitações referentes ao pDNA, têm surgido ultimamente diferentes estratégias, tendo-se aprofundado o potencial de uma geração de pequenas cassetes plasmídicas, os chamados DNAs minicirculares (mcDNAs). O mcDNA é classificado como um vetor de expressão genética circular não viral, episomal, covalentemente fechado, e que geralmente é biossintetizado em bactérias recombinantes, que consistem em “*backbones*” minimalistas, mas com o potencial de atender a todos os requisitos clínicos de expressão genética segura e duradoura [38].

O mcDNA é uma molécula de DNA composta exclusivamente por sequências eucarióticas [39], que foi isolada pela primeira vez por Cozzarelli e colaboradores, em 1968, através da estirpe *Escherichia coli* (*E. coli*) 15 [40]. A ausência de sequências procarióticas necessárias para a amplificação bacteriana, nomeadamente, a região de resistência a antibióticos e a origem de replicação, melhora a biocompatibilidade e eficácia do mcDNA em comparação com o pDNA. Além disso, as moléculas de mcDNA apresentam menores dimensões, o que as torna mais estáveis, aumenta a biodisponibilidade e melhora a eficiência de transfeção e conseqüentemente a atividade biológica devido aos maiores níveis de expressão da proteína terapêutica [39]. Uma expressão prolongada do gene alvo pode ser alcançada pela redução da morte de células transfetadas por inflamação devido a respostas a motivos CpG quando os plasmídeos são entregues por transportadores lipídicos [41].

Apesar de ter sido projetado para superar as limitações do pDNA, o mcDNA deriva de um pDNA, chamado plasmídeo parental (PP). Este contém sequências específicas, como os sítios de recombinação att, loxP, MRS ou attP/attB, que permitem a sua recombinação em duas moléculas filhas, o mcDNA e o mini-plasmídeo (mP) [42]. O mcDNA, contém apenas as sequências eucarióticas responsáveis pela ação terapêutica pretendida, enquanto que o mP retém todas as sequências procarióticas originalmente excisadas do PP [43].

1.5.1. Produção de DNA minicircular

A produção de mcDNA é realizada *in vivo*, numa estirpe de *E. coli* geneticamente modificada, através da indução da recombinação intramolecular de um PP [44]. Após a amplificação do PP, a fase de indução externa de bactérias vai ativar a expressão dos genes que codificam a maquinaria responsável pela conversão de modelos de PP em mcDNA, através da adição de um indutor (como, por exemplo, a L-arabinose), e começam a gerar os biofármacos de interesse – fase de recombinação. A recombinação depende da expressão de recombinases específicas (enzimas bacteriófagas que medeiam a reação de troca nestes substratos), que atuam sobre duas sequências de reconhecimento (locais de ancoragem híbridos específicos). Estes sítios estão estrategicamente colocados no *backbone* do PP, flanqueando as regiões responsáveis pela replicação em *E. coli* (*backbone* procariótico) e a parte eucariótica que contém o gene de interesse. Durante o processo de recombinação, as recombinases reconhecem e ligam-se aos sítios híbridos nos moldes de PP e a troca/remontagem da cadeia é promovida, dando origem a duas moléculas circulares covalentemente fechadas, o mcDNA e o mP. Cada um dos vetores contém dois novos locais híbridos, respetivamente (Figura 5) [38,44].

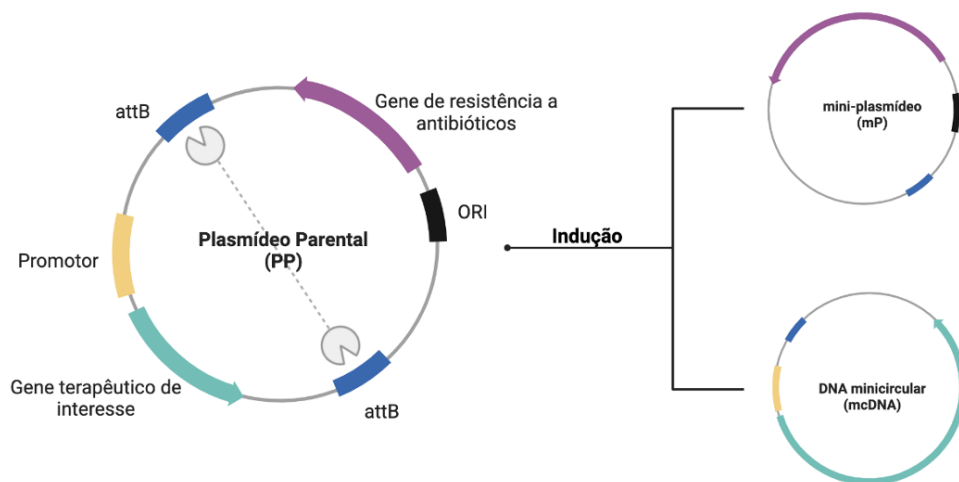


Figura 5. Representação esquemática da produção do vetor de DNA minicircular (mcDNA) a partir do plasmídeo parental (PP). Adaptado de [45].

O desenvolvimento de sistemas de produção de mcDNA tem-se focado em aumentar a eficiência de recombinação e minimizar formas multiméricas, recorrendo a diferentes recombinases induzíveis das famílias da tirosina (λ -integrase, Cre-recombinase e FLP-recombinase) e da serina (Φ C31-integrase e ParA-resolvase) [44]. Um dos casos, foi o estudo feito por Chen e colaboradores, que desenvolveram um sistema de recombinação, usando a estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T geneticamente modificada, o que permitiu a degradação das moléculas contaminantes através da inclusão de um sítio de sequência específica (32x -SceI) reconhecível pela endonuclease I-SceI na região procariótica. Assim, operando sob a regulação de um promotor pBAD/AraC, a Φ C31-integrase e a endonuclease I-SceI são expressas após adição do indutor L-arabinose. Após o processo de indução, a enzima recombinase Φ C31 realiza a conversão do PP em mP e em mcDNA, através do reconhecimento das sequências de recombinação attB e attP. Em seguida, as moléculas de PP e mP são degradadas pela endonuclease I-SceI, que reconhece o local de restrição 32x SceI presente nestes dois vetores [46].

Apesar de poderem ocorrer certos eventos, como o descrito anteriormente, para promover a clivagem e eliminação de mP e impurezas não combinadas de PP, cada processo pode ter um impacto diferente no seu processamento *downstream*. O conteúdo resultante do processamento recombinante, em que o mcDNA é frequentemente contaminado com PP, afeta não apenas o rendimento final de mcDNA, mas também o seu grau de pureza. Deste modo, tornam-se necessários métodos de purificação eficientes para o isolamento da biomolécula de interesse, das restantes impurezas PP e mP, que apresentam propriedades estruturais e químicas análogas ao mcDNA [42].

1.5.2. Clarificação de DNA minicircular

O processo *downstream* tem como objetivo a obtenção de um produto final com qualidade de acordo com recomendações e especificações das agências reguladoras, como a FDA ("*Food and Drug Administration*"). Este processo normalmente é dividido em três etapas: recuperação, purificação intermediária e polimento. No primeiro passo, a biomassa produzida durante a fermentação é recolhida através de centrifugação ou microfiltração. Subsequentemente, é necessário proceder à lise celular para libertação do mcDNA. Esta disrupção celular pode ser realizada através de métodos físicos ou químicos, sendo a lise alcalina o método mais utilizado [34]. A lise celular causa a rutura da membrana celular por meio do uso de pH elevado, um detergente (SDS) e uma base forte como NaOH, levando à libertação de todos os componentes intracelulares [47]. Na segunda etapa, procedimentos de clarificação e pré-purificação são realizados para diminuir os níveis de impurezas no lisado, como restos celulares, RNA, gDNA, endotoxinas e proteínas. A pré-purificação pode ser realizada por meio de ultrafiltração,

filtração de fluxo tangencial, precipitação, adsorção ou sistemas bifásicos aquosos [34]. Após a remoção dos detritos sólidos, é realizada uma redução do volume da amostra (concentração da amostra) utilizando álcoois como agentes precipitantes de ácidos nucleicos. Finalmente, uma etapa de clarificação é normalmente aplicada para precipitação de impurezas (RNA de alto peso molecular, gDNA, proteínas e endotoxinas) geralmente aplicando sais caotrópicos, como sulfato de amónio ou com outros agentes precipitantes como polietilenoglicol (PEG) e cloreto de cálcio [48].

Como referido anteriormente, algumas destas etapas consistem na aplicação de elevadas concentrações de sais caotrópicos e solventes orgânicos (como o isopropanol). A adição destes compostos representa um grande inconveniente para a indústria farmacêutica, não só pelo impacto económico mas também pela toxicidade e riscos ambientais associados à utilização de quantidades elevadas destes reagentes, não sendo assim recomendados pelas agências reguladoras para a preparação de mcDNA de grau farmacêutico [49,50]. Nos últimos anos, métodos alternativos como a clarificação recorrendo ao cloreto de cálcio tem surgido para superar essas limitações [51].

1.5.3. Purificação de mcDNA

A purificação de biomoléculas envolve a separação dos componentes em misturas complexas permitindo assim determinar tanto a identidade quanto a concentração de cada componente e, quando necessário, isolar um componente desejado de outras moléculas contaminantes para posterior análise. Normalmente recorre-se a diferentes técnicas de cromatografia, que se baseiam no princípio de que, sob um determinado conjunto de condições, solutos individuais dissolvidos numa fase móvel irão interagir diferencialmente com uma fase estacionária, modificada quimicamente. Desta forma, são exploradas diferenças inerentes entre biomoléculas, como por exemplo, tamanho molecular, hidrofobicidade, especificidade de ligação e carga, a fim de conseguir a separação umas das outras [52].

1.5.3.1. Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade (AC - “*Affinity Chromatography*”) é um tipo de cromatografia líquida, que separa a molécula de interesse com base em interações altamente específicas entre o alvo e o ligando imobilizado (Figura 6) [53]. Utiliza como fase estacionária um agente de ligação (ligando) biologicamente relacionado, para o isolamento e purificação de determinadas biomoléculas, tirando proveito da ligação específica e reversível que se estabelece e mimetiza muitas interações biológicas que ocorrem naturalmente no organismo, tais como interações de van der Waals, pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas e iónicas. Exemplos clássicos destas interações, são

aquelas que ocorrem entre anticorpo e antígeno, enzima e substrato ou entre hormona e recetor [54,55].

Assim, esta técnica recorre à imobilização de um dos pares de agentes de interação numa matriz cromatográfica (ligando de afinidade), fornecendo assim uma coluna com capacidade de reter seletivamente a biomolécula alvo, mesmo quando esta se encontra numa mistura complexa. Para a retenção do alvo, o tampão aplicado mimetiza o pH e a força iónica em que o ligando de afinidade estabelece o máximo de interações em simultâneo, o que promove a ligação do alvo, enquanto os outros componentes da amostra são eluídos por apresentarem pouca ou nenhuma afinidade. Os passos de eluição podem ser realizados aplicando um ligando competitivo, sendo esta uma eluição específica, ou através de mudanças de pH, força iónica ou composição da fase móvel, ou seja, uma eluição não específica. Assim, utilizando o ligando certo, esta técnica apresenta uma seletividade e simplicidade, podendo ser alcançada uma alta eficiência de purificação numa única etapa. Apesar disto constituir vantagens em relação ao aumento de seletividade e produtividade, a técnica também apresenta limitações ao nível dos custos mais elevados e da perda de propriedades aquando da imobilização do ligando e da reutilização das colunas. [53,55].

Almeida e colaboradores desenvolveram um método de purificação de mcDNA usando monolitos de lisina e de cadaverina [56]. O monolito de lisina foi capaz de isolar com sucesso o mcDNA, mas o rendimento de recuperação foi comprometido para alcançar altos níveis de pureza. Por outro lado, o suporte modificado com cadaverina mostrou melhor seletividade que o monolito anterior, alcançando um rendimento de recuperação melhor, sem perda de pureza. Em geral, apresenta-se como uma estratégia de purificação de mcDNA de custo reduzido, simples e prática [56].

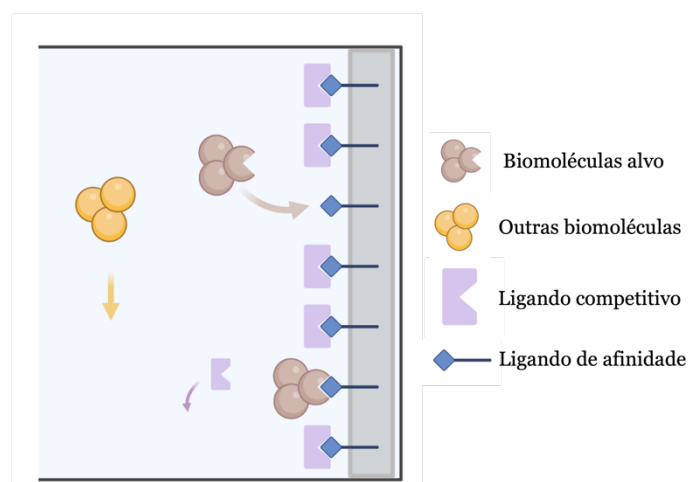


Figura 6. Cromatografia de afinidade. Adaptado de [57].

1.5.3.2. Cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel

Na cromatografia de exclusão molecular (SEC – “*Size Exclusion Chromatography*”), as moléculas são separadas com base nas diferenças de tamanho (Figura 7). À medida que as moléculas passam pela matriz empacotada numa coluna, que é constituída por esferas porosas, a separação é feita com base nos diferentes percursos que percorrem. As moléculas de menor dimensão, como RNA, endotoxinas e proteínas entram nos poros, sendo assim retardadas na coluna cromatográfica e demorando mais a eluírem. Já as moléculas como o DNA genómico e o DNA plasmídico de maiores dimensões, não conseguem entrar nos poros, sendo eluídas primeiro [58].

Uma das estratégias de purificação de mcDNA envolvendo SEC consiste na utilização da matriz *Sephacryl S-1000 SF*. Esta matriz apresenta uma ampla faixa de fracionamento, o que favorece a separação das macromoléculas como o DNA genómico (gDNA), PP e mcDNA que apresentam tamanhos moleculares distintos. Utilizando esta matriz conseguiu-se recuperar uma amostra de mcDNA que cumpre os critérios de pureza estabelecidos pelas agências reguladoras [59].

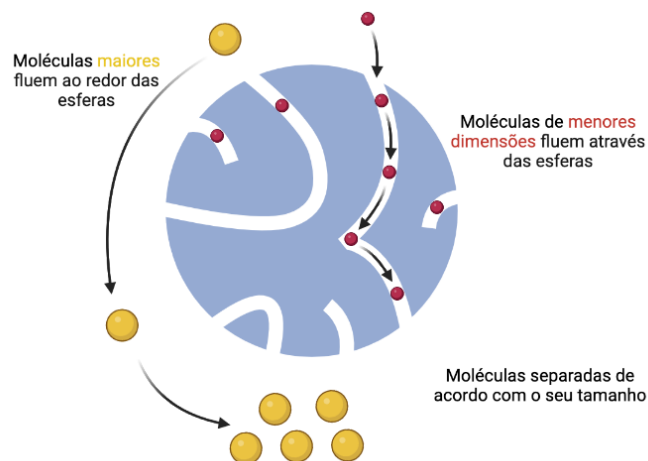


Figura 7. Cromatografia de exclusão molecular. Adaptado de [60]

1.5.3.3. Cromatografia de interação hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC – “*Hydrophobic Interaction Chromatography*”) é uma técnica amplamente utilizada que pode ser aplicada em diferentes etapas do processo *downstream*. As interações hidrofóbicas estão dependentes das moléculas de água que são a força motriz para o estabelecimento de ligação [61]. Ou seja, a separação das biomoléculas por HIC é promovida com base nas interações hidrofóbicas entre os ligandos hidrofóbicos imobilizados e as regiões apolares das biomoléculas (Figura 8). A ligação à matriz cromatográfica é promovida com elevadas concentrações de sal, nomeadamente de sulfato de amónio, que provoca a

remoção das moléculas de água que se encontram em torno dos grupos hidrofóbicos das biomoléculas e dos ligandos imobilizados, expondo-os e favorecendo a sua interação. A eluição é conseguida diminuindo a concentração de sal da fase móvel, o que enfraquece as interações anteriormente estabelecidas, ocorrendo a eluição das biomoléculas por ordem crescente de hidrofobicidade, ou seja, as mais hidrofóbicas eluem depois [62].

Esta cromatografia é frequentemente usada porque o dano estrutural das biomoléculas é reduzido e é mantida a sua atividade biológica. A temperatura, pH e sais são fatores que podem ter um impacto na retenção e seletividade desta técnica, sendo assim, necessário uma seleção e otimização das condições para que as biomoléculas sejam separadas com eficiência. No entanto, a necessidade da alta concentração de sal, pode ser vista como uma desvantagem principalmente no que diz respeito à aplicação industrial desta técnica, devido aos custos associados e ao impacto ambiental no uso dessas concentrações de sal [62].

Num estudo feito por Alves e colaboradores, foi estabelecida uma estratégia de purificação para o mcDNA recorrendo a uma primeira etapa de digestão enzimática e posteriormente usada HIC para isolamento de mcDNA. No entanto, apesar desta técnica providenciar bons resultados para isolar mcDNA, requer o uso de elevadas concentrações de sal para a HIC o que representa um custo adicional. Assim, a produção em larga escala torna-se demasiado dispendiosa [63].

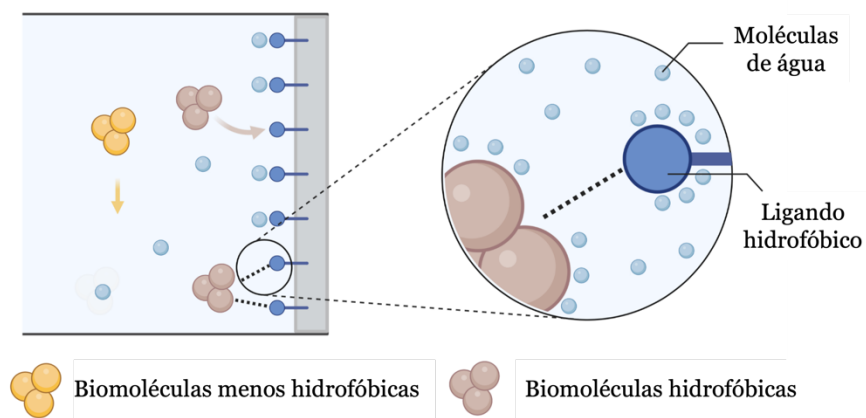


Figura 8. Cromatografia de interação hidrofóbica. Adaptado de [57].

1.5.3.4. Cromatografia de troca iónica

A cromatografia de troca iónica (IEX – “*Ion Exchange Chromatography*”) também envolve uma fase móvel e uma estacionária e a separação das moléculas é baseada na carga [64]. A IEX é aplicada para a purificação de proteínas, enzimas, anticorpos, péptidos, aminoácidos e ácidos nucleicos, bem como hidratos de carbono mais simples e

compostos orgânicos. A sua grande capacidade de manipulação de amostras, a ampla aplicabilidade, custos moderados, alta capacidade de resolução e a facilidade de aumento de escala e automação, tornam esta técnica cromatográfica das mais versáteis e amplamente utilizadas para purificação de biomoléculas [52].

Tipicamente, a fase móvel consiste num sistema tampão aquoso no qual a mistura a ser purificada é introduzida. Quanto à fase estacionária, geralmente, é uma matriz orgânica inerte derivada quimicamente com grupos funcionais ionizáveis (ligandos) que carregam um contra-íon deslocável de carga oposta. Dependendo do ligando da matriz, existem dois tipos de IEX possíveis, nomeadamente a troca aniónica e catiónica (Figura 9). Os ligandos da matriz podem incluir protões, grupos hidróxido, iões monoatômicos de carga única ou de carga dupla, iões inorgânicos poliatômicos, bem como bases orgânicas e ácidos [64].

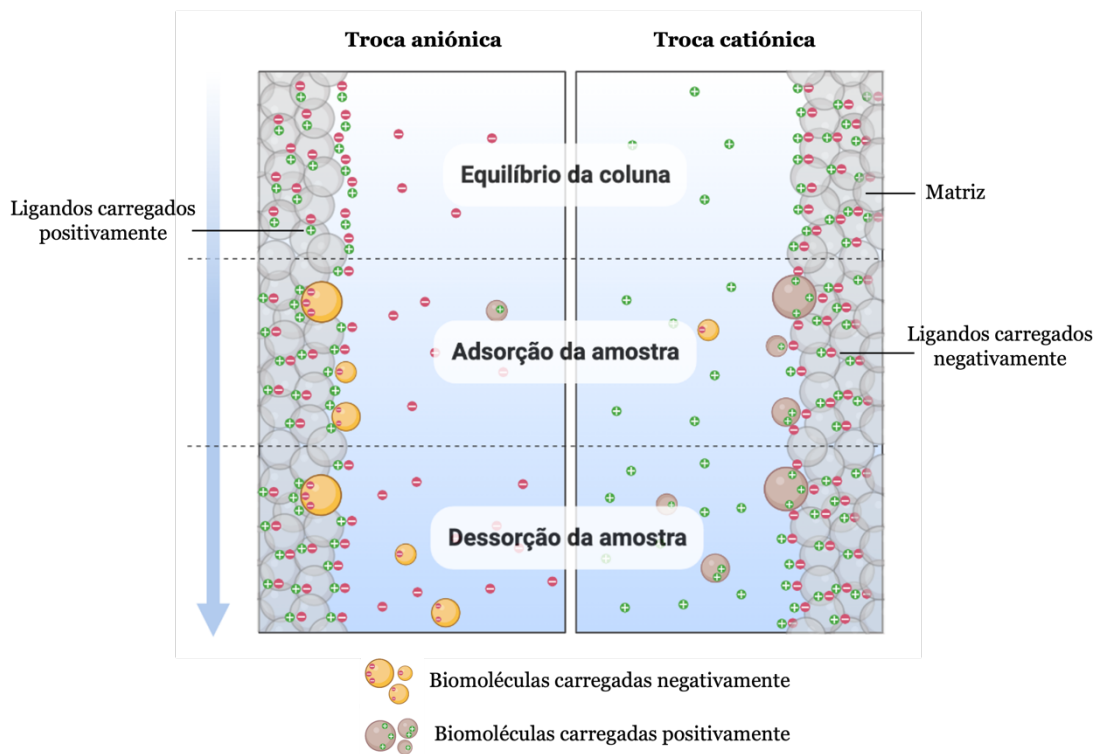


Figura 9. Cromatografia de troca iónica. Adaptado de [52].

A primeira etapa do processo de IEX é o equilíbrio do ligando (que fica associado a contra-íons de carga oposta), com condições de pH e força iónica, que permitem a ligação das moléculas alvo. Quando se aplica a amostra, as moléculas com carga contrária aos ligandos da matriz, deslocam os contra-íons e ligam-se reversivelmente aos ligandos. As moléculas eluem por ordem crescente de interação, quando aplicado um aumento da força iónica ou uma alteração de pH, ou seja, as moléculas que não ligam, ou com ligações mais fracas são as primeiras a eluir. Após isto, reequilibra-se com as condições iniciais

para próximas purificações [65]. No caso da cromatografia de troca aniônica, a matriz da fase estacionária exibe um grupo funcional carregado positivamente, onde se ligam biomoléculas aniônicas presentes na amostra. Se por outro lado, o ligando da fase estacionária for carregado negativamente, estamos perante uma cromatografia de troca catiônica, e aqui é aplicada uma amostra com biomoléculas catiônicas para se ligarem à matriz. [52,64].

A separação é conseguida porque diferentes moléculas têm diferentes graus de interação com os ligandos, devido a diferenças nas suas cargas, densidade de carga e distribuição da carga nas superfícies. Essas interações, como descrito anteriormente, podem ser controladas por condições como a força iônica e o pH. Apesar das diferenças nas propriedades da carga dos compostos biológicos serem muitas vezes consideráveis, uma vez que a IEX é capaz de separar espécies com diferenças muito pequenas nas propriedades (como por exemplo, duas proteínas que diferem apenas num aminoácido carregado), torna-a uma técnica de separação muito poderosa. Permite-nos ainda poder escolher entre ligar as moléculas de interesse, enquanto os contaminantes passam pela coluna, ou ligar os contaminantes e permitir a passagem da substância de interesse sem ligação (cromatografia negativa) [65].

Diamantino e colaboradores publicaram uma estratégia cromatográfica de troca aniônica fraca. Os resultados obtidos sugerem ser possível obter uma purificação de mcDNA sc com sucesso usando um monolito comercial CIM[®] DEAE-1, promovendo a eliminação das impurezas resultantes do processo de recombinação (PP e mP), bem como, das impurezas decorrentes da produção em *E. coli*. Além disso, é vantajoso o uso desta cromatografia por se promover uma rápida separação, que garante uma estabilidade estrutural do mcDNA [39].

1.6. Membranas adsorventes

A separação e purificação de biomoléculas desempenha um papel cada vez mais importante em aplicações biofarmacêuticas e normalmente é realizada por cromatografia em coluna. No entanto, esta cromatografia convencional apresenta diversos desafios, tais como a necessidade de pré-empacotamento da resina, condições severas de limpeza e dificuldade de esterilização, bem como a demora do procedimento. As altas pressões operacionais necessárias, juntamente com a alta resistência à transferência de massa dentro do leito empacotado, acrescem outras limitações tais como baixos rendimentos e incapacidade de processamento em larga escala. Deste modo, como o processamento *downstream* corresponde até 80% do custo total da

produção de bioprodutos, tecnologias e meios de produção mais eficientes são necessários para reduzir os custos [66].

Novos suportes cromatográficos baseados em membranas micro/macroporosas funcionalizadas com ligandos iônicos, hidrofóbicos ou de afinidade, chamadas membranas adsorventes, têm sido desenvolvidas para ligar biomoléculas presentes num lisado bruto clarificado de forma semelhante à realizada em cromatografia convencional [60].

De modo geral, a cromatografia em dispositivos cromatográficos contínuos de fluxo convectivo, como monolitos e membranas adsorventes tem emergido como uma alternativa rápida e viável à cromatografia convencional, especialmente para biomoléculas de grandes dimensões como o DNA ou os vírus [60].

1.6.1. Membranas de afinidade

De maneira a superar os problemas associados à AC, a cromatografia de membrana de afinidade tem atraído atenção, apresentando vantagens sobre a AC tradicional (baseadas em colunas de esferas porosas). O processo altamente eficiente da cromatografia por membrana de afinidade é baseado no uso de camadas finas de fases estacionárias poliméricas macroporosas finamente organizadas e bem controladas na forma de discos rígidos de 2 a 3 mm de espessura. Como resultado do fluxo convectivo da fase móvel através dos poros, a resistência à transferência de massa é reduzida, o que leva a um processamento rápido que melhora as etapas de adsorção, lavagem, eluição e regeneração. Devido à estrutura macroporosa, a tecnologia de membranas apresenta uma menor queda de pressão, maior taxa de fluxo e maior produtividade do que a cromatografia por coluna. Vantagens adicionais como fácil empacotamento e aumento de escala, bem como a improvável incrustação/obstrução, tornam a cromatografia de membrana um processo de separação em larga escala vantajoso em relação às alternativas [67].

Como descrito para a AC, a afinidade é usada para descrever a interação específica e reversível que ocorre entre um ligando e a biomolécula alvo. Por explorar interações para purificação de agentes terapêuticos e estes possuírem requisitos de pureza muito rigorosos, é necessário assegurar que os ligandos sejam acoplados com uma ligação forte à membrana para evitar que haja vestígios destes no produto final. Além disso, o ligando imobilizado deve manter a sua atividade e ter a possibilidade de interagir com as moléculas alvo enquanto estiver ligado covalentemente ao suporte [68].

Enquanto que as membranas cromatográficas de troca iônica e de interação hidrofóbica estão presentes no mercado como um produto comercial consolidado, as membranas de afinidade ainda são objeto de intensa pesquisa, mas que até ao momento ainda não atingiram a comercialização. No entanto, as que estão disponíveis num número limitado de fornecedores são apenas para aplicações específicas, ou seja, com Proteína A imobilizada para purificação de IgG, ou podem ser personalizadas para moléculas alvo específicas. Mas, é possível encontrar no mercado membranas pré-ativadas, nomeadamente com grupos funcionais epóxi ou aldeído, prontas para o acoplamento de ligandos [69].

1.6.2. Membranas de interação hidrofóbica

Relembrando que, a HIC explora as interações entre os ligandos hidrofóbicos imobilizados e as regiões apolares na superfície das biomoléculas, o mesmo acontece nas membranas de interação hidrofóbica. Assim, a purificação de pDNA por HIC depende das diferentes hidrofobicidades das isoformas do pDNA, ácidos nucleicos de cadeia simples e impurezas de endotoxinas. A técnica é capaz de separar o pDNA sc de impurezas de ácidos nucleicos mais hidrofóbicos (RNA, gDNA), porque na presença de altas concentrações de um sal cosmotrópico têm as suas bases hidrofóbicas empacotadas e, a interação hidrofóbica com o meio HIC é mínimo. Por outro lado, as impurezas de ácidos nucleicos de cadeia simples apresentam uma maior exposição das bases hidrofóbicas, interagindo fortemente com os ligandos hidrofóbicos. O mesmo acontece com as endotoxinas altamente hidrofóbicas [70].

No caso da aplicação de membranas para isolamento de pDNA de lisados, Pereira e colaboradores em 2010 conseguiram isolar o pDNA pVAX1-LacZ de impurezas (principalmente de RNA), usando uma membrana modificada com um ligando de cadeia alquil linear que apresenta comportamento hidrofóbico. O método foi descrito como rápido, simples e eficaz possibilitando a redução do número de etapas nos processos de purificação de pDNA [71].

1.6.3. Membranas de troca iónica

Tal como descrito anteriormente, as membranas de troca iónica têm diferentes ligandos de troca catiónica ou aniónica inseridos na matriz da membrana. Neste formato de cromatografia, a separação ocorre devido às interações reversíveis entre a biomolécula de interesse e os grupos funcionais dos ligandos imobilizados na superfície da membrana. Uma membrana de troca catiónica tem ligandos carregados negativamente, que se ligam a moléculas carregadas positivamente e uma membrana de troca aniónica é composta por ligandos carregados positivamente, que se ligam a moléculas com carga

oposta. Com base no grau de ionização dos grupos funcionais dos ligandos, como uma amina quaternária com grupo $-N^+(CH_3)_3$ e uma dietilamina com grupo funcional $-N^+(C_2H_5)_2$, são classificadas como membranas de troca aniônica forte e fraca, respectivamente [72].

As membranas de troca aniônica, normalmente são usadas para ligar biomoléculas grandes, como o DNA, visto que a pH superior a 7,0 (pH tipicamente utilizado nestas membranas) apresenta carga negativa [73]. A purificação de moléculas de DNA baseia-se na interação entre os grupos dos ligandos carregados positivamente na matriz e os fosfatos carregados negativamente no DNA. Os fatores que influenciam a ligação ou eluição das biomoléculas à matriz são o pH e a concentração de sal utilizados, funcionando em amplas faixas de condições que podem otimizar a separação do DNA do RNA e outras impurezas. O equilíbrio da fase estacionária é feito com um tampão de ligação que apresenta um determinado pH e força iônica que garantirá que, quando a mistura for adicionada, a biomolécula alvo se ligue e as impurezas não. Assim, uma baixa concentração de sal favorece a ligação do DNA, enquanto o RNA e as restantes impurezas podem logo eluir. A eluição das moléculas ligadas geralmente é conseguida através do aumento da força iônica (concentração de sal) ou alteração do pH do tampão. Quando o sal é adicionado, os íons competem com as moléculas ligadas, forçando-as a eluir. Então, à medida que se aumenta o teor do sal, o DNA é eluído [74].

A cromatografia usando membranas de troca iônica, tem como principal dificuldade a remoção de contaminantes como RNA e proteínas quando usada para purificação de pDNA. No entanto, Zhong e colaboradores conseguiram a purificar pDNA pela otimização das etapas de lavagem com baixas concentrações de sal, enquanto os ácidos nucleicos (pDNA) que estão fortemente ligados ao suporte da membrana requerem elevadas concentrações de sais para serem eluídos [75].

1.7. Terra diatomácea

A terra diatomácea (DE - "*Diatomaceous Earth*") é um recurso natural económico, ecológico e abundante, que tem vindo a ser utilizada na indústria biotecnológica [76]. É obtida de uma rocha sedimentar siliciosa, composta principalmente por fósseis e restos de algas unicelulares (as diatomáceas) que se encontram comprimidas em rochas macias e calcárias [77]. As suas propriedades dependem do local de origem [77], mas normalmente apresenta uma baixa densidade, baixa condutividade térmica, reatividade química inerte com a maioria dos líquidos e gases e pouca solubilidade em água. Assim, estas características valiosas classificam a DE como um material natural muito atraente

com propriedades distintas, ou seja, alta permeabilidade, alta porosidade e grande área superficial [78].

A DE é usada como auxiliar de filtração, por ser altamente porosa. Após ser adicionada às misturas das amostras, permite que a pasta criada em cima do filtro se torne permeável, evitando o entupimento e bloqueio do filtro durante o processo de filtração (Figura 10) [79].

Labisch e colaboradores, fizeram recentemente um estudo, onde analisaram o efeito da aplicação de DE na clarificação de vetores lentivirais. Comprovaram que a adição de DE reduz a turbidez de forma eficiente, diminuindo as impurezas sendo benéfica para alcançar tempos de filtração mais curtos. Provaram assim que, a clarificação com DE permite a realização de um processo mais rápido e seguro, eficiente e robusto [79].

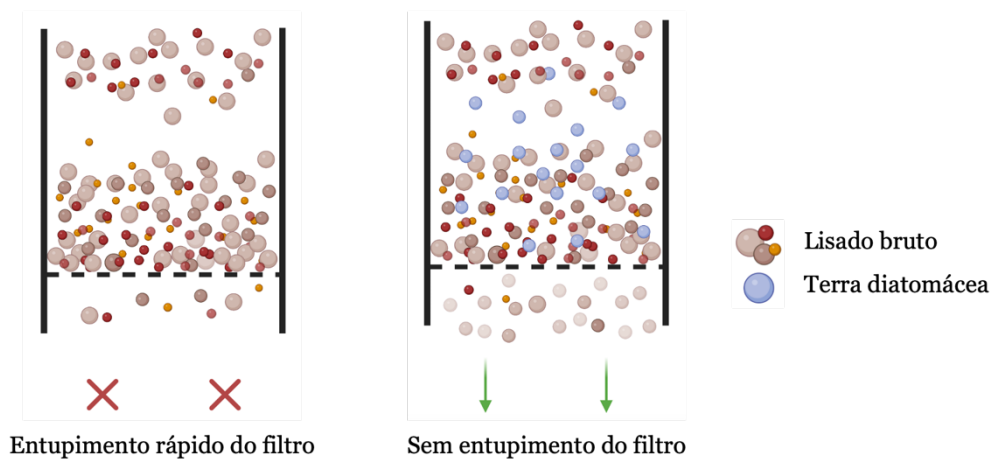


Figura 10. Representação do efeito da adição da DE. Adaptado de [80]

Capítulo 2 – Objetivos

O HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do cancro do colo do útero, sendo este o quarto cancro que mais afeta e causa morte em mulheres em todo o mundo. As oncoproteínas E6 e E7 do vírus são as responsáveis pela progressão do tumor, devido à degradação e inativação dos supressores de tumor p53 e pRb, respetivamente. Desta forma, a utilização de biofármacos que silenciem a expressão das oncoproteínas referidas e que restabeleçam os níveis de p53 e pRb tornou-se uma estratégia promissora para o tratamento do cancro do colo do útero. O vetor de mcDNA tem sido uma alternativa promissora, na vertente de terapia génica, ao vetor não-viral de DNA plasmídico, devido à ausência de genes bacterianos e por favorecer a expressão dos genes alvo, tornando-o um vetor mais seguro. Contudo, o processo biotecnológico para obtenção destes biofármacos envolve vários passos (nomeadamente centrifugações; concentração com solventes orgânicos; clarificação com altas concentrações de sal e métodos de purificação que consistem em exclusão molecular ou cromatografia de afinidade, que são demorados ou não estão disponíveis comercialmente) que tornam o processo *downstream* bastante dispendioso e demorado do ponto de vista da indústria farmacêutica. É assim essencial o desenvolvimento de estratégias alternativas.

Tendo em conta o referido acima, o presente trabalho tem como objetivo a implementação de uma estratégia alternativa aos procedimentos já estabelecidos para a extração e purificação de mcDNA. Esta nova abordagem de recuperação, baseada no tratamento de lisado bruto com cloreto de cálcio e DE passa pela substituição de passos de concentração, clarificação e respetivas centrifugações da metodologia convencional. Assim, foi necessário o desenvolvimento de algumas etapas, nomeadamente:

1. Produção de um vetor mcDNA que codifica o gene pri-miR-375, para utilização em terapia génica contra o cancro do colo do útero;
2. Clarificação do lisado com cloreto de cálcio e DE, para filtração direta;
3. Aplicação do lisado bruto clarificado com cloreto de cálcio e DE em membranas adsorventes Sartobind®;
4. Avaliação do grau de pureza, recuperação e integridade da biomolécula alvo e comparação com processos já existentes.

Capítulo 3 – Materiais e métodos

3.1. Materiais

Ao longo do trabalho todos os filtros Sartolab®, a DE e as membranas Sartobind® utilizados foram gentilmente oferecidos pela empresa Sartorius (Sartorius Stedium Biotech, GöHingen, Germany).

3.2. Métodos

3.2.1. Produção de mcDNA

O processo de produção da estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T (System Biosciences, EUA), iniciou com a inoculação em meio sólido (placas de LB-agar contendo kanamicina (50µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, EUA)), de modo a promover o crescimento de colónias isoladas, “overnight” a 37°C. Posteriormente, algumas dessas colónias foram transferidas para um erlenmeyer de capacidade 250 mL, contendo um volume de 62,5 mL de meio *Terrific Broth* (TB) (Biokar Diagnostics, Allone, França) (composto por 24g/L extrato de levedura, 20g/L triptona, 4mL/L glicerol, 0,017M KH₂PO₄, 0,072M K₂HPO₄ e suplementado com 50mg/mL de kanamicina). Pretende-se nesta fase promover o crescimento bacteriano a 42°C e 250rpm, através de pré-fermentação até atingir uma densidade ótica (DO) a 600nm (DO_{600nm}) de aproximadamente 2,6. Quando atingida essa DO, procedeu-se ao cálculo da quantidade de cultura bacteriana necessária a transferir para a fermentação num erlenmeyer de capacidade 1000 mL, contendo um volume de 250 mL do mesmo meio de cultura, de forma a que esta inicie com uma DO de 0,2. O crescimento bacteriano foi novamente promovido até atingir uma DO de aproximadamente 5/6 num agitador orbital sob as condições de 42°C e 250rpm.

Após atingida a DO_{600nm} ≈ 5/6, fizeram-se ciclos de 10 min de centrifugação a 2000g, de maneira a recuperar apenas as células para serem adicionadas à mistura de indução (composta por 25g/mL de meio *Luria-Bertani Broth* (LB) (Biokar Diagnostics, Allone, França) com 0,01% do indutor L-arabinose e 0,04M NaOH), para induzir a produção de mcDNA. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 5 mL de meio LB e transferido para um erlenmeyer de capacidade 1000 mL, contendo um volume de 250 mL de meio de indução. O processo de indução foi realizado durante 1 h, a 30°C sob agitação de 250 rpm. No final, as células foram recuperadas através de centrifugação a 4500rpm, durante 10 min a 4°C. Descartando o sobrenadante, os *pellets* foram armazenados a -20 °C.

3.2.2. Extração modificada de mcDNA

Após o *pellet* bacteriano, resultante de 125 mL de fermentação, estar completamente descongelado, adicionou-se 10 mL de solução A (50mM glucose, 25mM de Tris-HCl 10mM de EDTA, pH 8,0) e agitou-se o falcon vigorosamente no vórtex. Mudou-se a mistura para tubos de lise, onde se adicionou 10 mL de solução B (200mM NaOH; 1% SDS (m/v)), homogeneizou-se cuidadosamente e incubou-se durante 5 min à temperatura ambiente. Após esse período de incubação, foram adicionados 10 mL de solução C (3,0M de acetato de potássio, pH 5,5) e incubou-se no gelo por 20 min após homogeneização. Seguiram-se duas centrifugações de 30 min, a 20000g e a 4°C, de onde se descartou o *pellet* que continha detritos celulares, DNA genómico e proteínas. Ao sobrenadante adicionou-se 0,7 volumes de isopropanol e incubou-se em gelo durante 30 min de maneira a promover a precipitação principalmente de ácidos nucleicos e assim concentrar a amostra. Fez-se uma centrifugação a 16000g durante 30 min, a 4°C, de onde se recuperou o *pellet* ressuspendendo-o em 1 mL de tampão 10mM de Tris-EDTA, pH 8,0. De seguida, realizou-se um processo de clarificação da amostra para eliminar impurezas como RNA de alto peso molecular e proteínas. Para tal, adicionou-se sulfato de amónio numa concentração de 2,5M, agitou-se suavemente e incubou-se por 15 min em gelo. Foi feita uma última centrifugação a 16000g durante 20 min a 4°C e recuperou-se o sobrenadante.

Quando necessário, as amostras foram dessalinizadas e concentradas usando concentradores Vivaspín® (10kDa) com tampão 200mM Tris-HCl, pH 8,0 para um volume final de 1 mL, e guardadas a -80°C de forma a serem posteriormente analisadas na coluna analítica.

3.2.3. Clarificação de lisado com CaCl₂

O processo iniciou-se, após o descongelamento do *pellet* resultante de 125 mL de fermentação, com a adição dos três tampões de lise (como descrito no ponto 3.2.). Após a adição dos tampões, centrifugou-se o conteúdo dos tubos, de onde se recuperou o sobrenadante e descartou-se o *pellet*. Ao sobrenadante adicionou-se CaCl₂ para concentrações entre 0,25M e 0,75M, fazendo a sua dissolução com movimentos circulares suaves e posterior incubação por 15 min em gelo. Após a incubação, centrifugou-se a 16000g durante 30 min a 4°C para promover a precipitação de gDNA, RNA e proteínas, e assim se recuperar o sobrenadante, que se diluiu em tampão 10mM Tris-HCl, pH 8,0 (numa diluição 1:2).

A amostra foi dividida em duas amostras equivalentes, tratadas a partir daqui de maneira diferente. Uma amostra de 30 mL foi concentrada diretamente para 1 mL final para

posterior análise numa coluna analítica, enquanto a outra amostra de 30 mL foi filtrada primeiro com um filtro de 0,22µm (Sartolab® BT 150, 0,22µm, PES) e só depois concentrada para o volume final de 1 mL para posterior análise.

3.2.4. Avaliação de DNA na coluna analítica CIMac™

Os ensaios cromatográficos foram realizados no sistema AKTA Pure (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) com o *software* UNICORN™ (versão 6.3). A quantificação de DNA total foi determinada recorrendo a uma coluna analítica CIMac™ pDNA. As amostras foram injetadas na coluna e os ensaios foram realizados de acordo com as condições de equilíbrio e eluição do método analítico modificado, previamente descrito Sousa e colaboradores [81]. Brevemente, a coluna analítica foi equilibrada com 600mM NaCl em tampão 200mM Tris-HCl (pH 8,0). Após algum tempo, a amostra foi injetada e foi aplicado um gradiente linear de 600mM a 700mM em 200mM Tris-HCl (pH 8,0), durante 10 min, a um fluxo de 1mL/min.

Para a quantificação de DNA foi utilizada uma curva de calibração com padrões de pDNA previamente purificados, com um range de concentrações de 1 a 100µg/mL, da qual resultou a seguinte equação da reta: $y = 0,4284x - 0,1921$, em que y representa a área do pico (mAU) e x concentração (µg/mL) [81].

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

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

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

3.2.5. Clarificação de lisado com CaCl₂ e DE

O primeiro passo de lise alcalina, realizou-se de acordo com o descrito no ponto 3.2., adicionando os tampões A, B e C no próprio falcon onde se encontra o *pellet* celular. De seguida, adicionou-se CaCl₂ sólido e homogeneizou-se suavemente. Quando este já se encontrava todo dissolvido, acrescentou-se à mistura 5,4g de DE de acordo com as recomendações do fabricante (80g produto puro/L lisado, tendo em conta que o produto puro presente no pacote se encontra misturado numa razão 1DE/1,25 água), e homogeneizou-se. A amostra foi filtrada, a vácuo, com um filtro de 0,22µm de maior área

(Sartolab® BT 180C5, 0,22µm, PES) (Figura 11). A amostra resultante desta filtração foi diluída (diluição 1:2) em tampão 10mM Tris-HCl, pH 8,0 e guardada a -20°C.

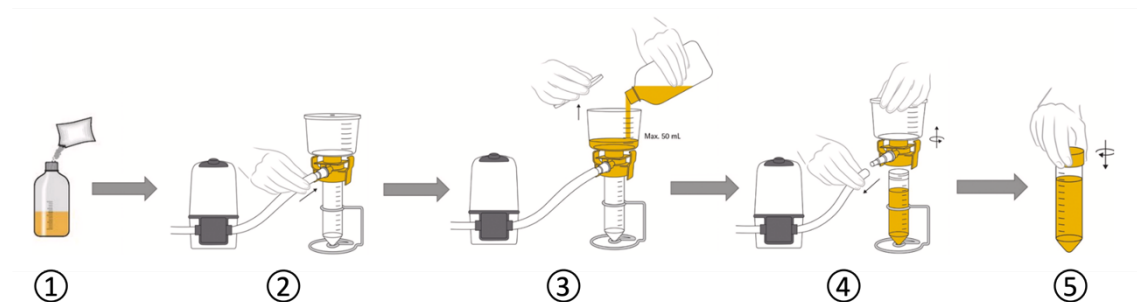


Figura 11. Representação esquemática do processo de filtração na clarificação do lisado com CaCl₂ e adicionando DE. 1 – Adição de DE; 2 – Montagem do sistema de filtração; 3 – Passagem da mistura pelo filtro; 4 – Desmontagem do sistema de filtração; 5 – Armazenamento da amostra. Adaptado de [79].

3.2.6. Ensaio com a membrana Sartobind® Q75

O processo de purificação, recorrendo à membrana adsorvente Sartobind® Q75 (área da membrana: 75 cm², volume de coluna (cv): 2,1 mL) foi realizado no equipamento AKTA-Avant (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, EUA), utilizando o *software* UNICORN™ (versão 6.3). O equipamento foi lavado primeiro com água Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA) e depois com solução tampão de equilíbrio Tris-EDTA (10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0). De seguida, a membrana foi também equilibrada com o mesmo tampão. Após os parâmetros estabilizados, através da bomba de amostra, a amostra pré-tratada (como descrito no ponto 3.5.) foi carregada a um fluxo de 1mL/min. De seguida as moléculas que não interagiram com a membrana foram lavadas com o tampão de equilíbrio e posteriormente iniciou-se um gradiente crescente de NaCl dissolvido no mesmo tampão da etapa de equilíbrio (também com uma taxa de fluxo de 1mL/min). Ao longo dos ensaios os parâmetros como a absorção de UV a 260nm, o pH e a condutividade foram registados e avaliados. No final de cada ensaio a coluna foi reequilibrada com o tampão de equilíbrio. Durante todo o processo foram recolhidas frações para posterior análise.

3.2.7. Ensaio com a membrana Sartobind® D75

Da mesma maneira que descrito no ponto anterior, fizeram-se ensaios com o lisado na membrana adsorvente Sartobind® D75 (área da membrana: 75 cm², volume de coluna (cv): 2,1 mL). O processo foi feito de igual forma, recorrendo ao equipamento AKTA-Avant, para equilibrar a membrana com solução tampão Tris-EDTA (10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0). Após os parâmetros estabilizados, através da bomba de amostra, o lisado foi injetado a um fluxo de 1mL/min. Deixado correr algum tempo, iniciou-se o ensaio

com um caudal de 1mL/min, através de um gradiente crescente de NaCl. Ao longo dos ensaios foram também recolhidas frações para análise e a coluna foi sempre reequilibrada entre ensaios.

3.2.8. Eletroforese em gel de agarose

Todas as amostras foram analisadas em gel de agarose. Para a preparação dos géis foi utilizado tampão TAE 1x (40mM de base Tris, 20mM de ácido acético e 1mM de EDTA, pH 8,0), (1% (w/v)) agarose (Hofer, San Francisco, EUA) e (1μL/mL) de reagente *Greensafe* (NZYTech – Genes & Enzymes, Portugal). As amostras de 20μL foram preparadas, com 2μL de *Loading Buffer* (0,2g de Azul de Bromofenol, 6 mL de Glicerol 50% e 4 mL de água Milli-Q) e injetadas nos poços do gel, sendo a corrida realizada a 110V por 40 min. No final, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) num transiluminador UVITEC Fire-Reader (UVITEC, UK).

3.2.9. Análise das amostras purificadas por densitometria de bandas

A pureza das amostras de DNA foi também analisada através da razão entre a densidade relativa da banda correspondente ao DNA e a densidade relativa da banda correspondente ao RNA (equação (4)), utilizando o *software* Image J, versão 1.53t. Ainda recorrendo a este programa foi calculada a percentagem de recuperação de DNA através da comparação da área da amostra avaliada com a área da amostra de lisado (equação (3)).

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\text{área da amostra avaliada}}{\text{área da amostra de lisado bruto tratado com } 0,4M \text{ CaCl}_2 \text{ e DE}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ pureza} = \frac{\text{densidade relativa da banda de DNA}}{\text{densidade relativa da banda de RNA}} \times 100 \quad (4)$$

Capítulo 4 – Resultados e discussão

4.1. Clarificação do lisado com CaCl_2

O processo de extração de pDNA tem como objetivo lisar as células hospedeiras e aplicar um processo de pré-tratamento à amostra de lisado para posteriormente ser realizada uma purificação através de técnicas de cromatografia. O ponto de partida é um *pellet* bacteriano, que após sofrer uma lise celular alcalina (por ação do NaOH), torna-se um lisado complexo e viscoso devido sobretudo à presença de gDNA que se degrada nestas condições. Neste lisado, apesar da eliminação da maior parte do gDNA que precipita após adição de acetato de potássio a pH ácido, ainda estão presentes grandes quantidades de RNA e proteínas. Assim, a precipitação dos ácidos nucleicos é depois promovida pela adição de isopropanol, que vai permitir a concentração da amostra. Posteriormente, uma fração de impurezas (como proteínas, endotoxinas e RNA de alto peso molecular) pode ser removida com uma etapa adicional de precipitação com sulfato de amónio, que vai ajudar a obter uma amostra clarificada. No entanto, a adição destes compostos representa um grande inconveniente para a indústria farmacêutica, não só pelo alto impacto económico, mas também pela toxicidade e riscos ambientais associados à utilização de quantidades elevadas dos dois agentes precipitantes (por exemplo, o sulfato de amónio tem um alto potencial de eutrofização e o isopropanol é inflamável, sendo ambos produzidos a partir de fontes não renováveis) [49,82].

Tendo em conta estes fatores, o principal objetivo do estudo passou por apresentar uma alternativa ao uso dos agentes precipitantes, tornando o isolamento do DNA um método mais económico, rápido e menos prejudicial para o ambiente.

A primeira abordagem explorada de maneira a promover a remoção de impurezas como gDNA, RNA e proteínas, foi a clarificação do lisado obtido após a lise alcalina de um *pellet* proveniente da fermentação a partir da estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T, com a adição de CaCl_2 .

Eon-Duval e colaboradores, fizeram um estudo onde analisaram a eficácia de diferentes sais na remoção de RNA. Esses sais foram escolhidos de acordo com a sua tensão superficial: sais com alta tensão superficial são anticatódicos e reduzem a solubilidade das proteínas (“*salting out*”). Assim, selecionaram sais com tensão superficial molar crescente: sulfato de amónio, sulfato de sódio, citrato tripotássico e CaCl_2 . Comprovaram que a adição de CaCl_2 promove a precipitação de RNA, além da remoção substancial de outras impurezas como proteínas, endotoxinas e gDNA [51]. Deste modo e, tendo por

base a literatura, foram testadas três concentrações diferentes de CaCl_2 : 0,75M; 0,5M e 0,25M [83]. Cada amostra foi tratada com e sem filtração, usando um filtro com tamanho de poro de 0,22 μm (Sartolab® BT 150, 0,22 μm , PES). Foi ainda realizada uma etapa de lavagem à superfície do filtro com tampão 10mM Tris-HCl (pH 8,0) para recuperar o que pudesse ter ficado retido na superfície do filtro.

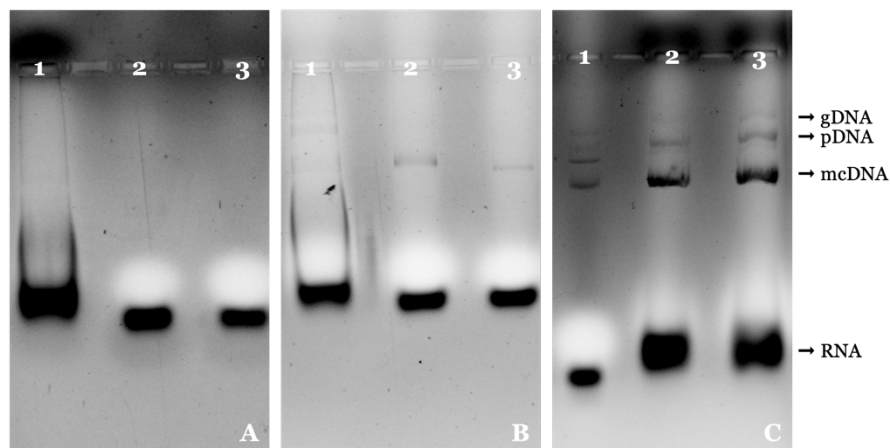


Figura 12. Influência do CaCl_2 na remoção de impurezas. Eletroforese das amostras de lisados clarificados com diferentes concentrações de CaCl_2 : A - 0,75M; B - 0,5M; C - 0,25M. 1 - Amostra retida no filtro; 2 - Amostra inicial/não filtrada; 3 - Amostra filtrada.

Como se pode verificar pela Figura 12, a aplicação de 0,25M de CaCl_2 evita a precipitação do mcDNA e pDNA comparando com as restantes concentrações aplicadas. No entanto, essas concentrações mais elevadas promovem uma maior remoção de impurezas, nomeadamente de RNA. Podemos observar também que em todos os passos de lavagem do filtro (linha 1 da Figura 12 A, B e C), houve a retenção de uma parte da amostra de lisado, contendo todos os tipos de ácidos nucleicos (independentemente do tamanho). Assim, para esclarecer se a retenção das moléculas não é resultado da utilização contínua do mesmo filtro, foi realizado outro ensaio com 0,25M de CaCl_2 , mas desta vez com um filtro de 0,22 μm novo.

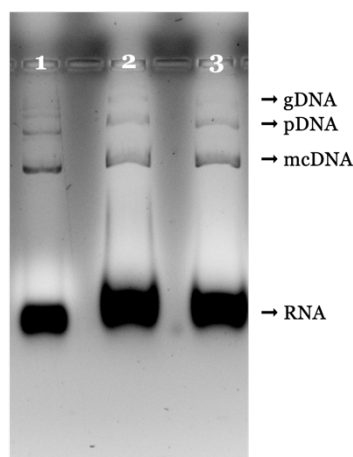


Figura 13. Eletroforese do lisado clarificado com 0,25M CaCl₂ usando filtro novo de 0,22μm (Sartolab® BT 150, 0,22μm, PES). 1 – Amostra retida no filtro; 2 – Amostra inicial/não filtrada; 3 – Amostra filtrada.

O ensaio demonstrou que o filtro novo apresentou o mesmo comportamento que o filtro reutilizado, retendo algumas quantidades de DNA e RNA, como podemos observar pela Figura 13. Podemos também constatar que, a aplicação do filtro, não ajuda na separação das biomoléculas de acordo com o seu tamanho, visto que uma percentagem de todas as moléculas fica retida na sua superfície.

Ainda em relação às diferentes concentrações testadas (Figura 12), embora a banda de DNA seja mais evidente com a concentração de 0,25M de CaCl₂, também as impurezas estão presentes em maiores quantidades, nomeadamente o RNA de alto peso molecular, e o gDNA que dificulta as quantificações na coluna analítica devido a fenómenos de “*clogging*” do monolito analítico com moléculas de grandes dimensões como o gDNA [84]. Portanto, optou-se por explorar as quantificações das amostras de lisado tratadas com a concentração intermédia de 0,5M de CaCl₂.

Para se calcular o grau de pureza e percentagem de recuperação, a amostra clarificada com 0,5M de CaCl₂, foi injetada numa coluna analítica CIMac™. Os ensaios nesta coluna foram realizados utilizando as condições de equilíbrio e eluição do método analítico modificado, previamente descrito por Sousa e colaboradores [81]. Após a injeção da amostra foi obtido um pico resultante de impurezas que não ligaram à coluna, nomeadamente o RNA, e durante o gradiente linear crescente de NaCl foi obtido outro pico correspondente à eluição do DNA que tinha interagido com a coluna. Os picos apresentados no cromatograma da Figura 14 foram integrados de forma a obter as áreas de cada pico e assim calcular o grau de pureza e da percentagem de recuperação [66]. Os resultados obtidos estão esquematizados na Tabela 3.

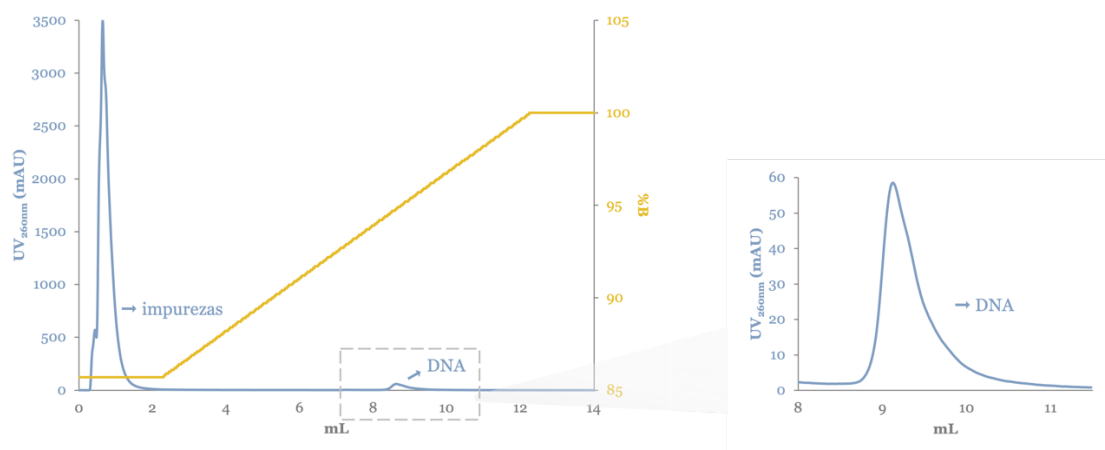


Figura 14. Perfil cromatográfico na coluna analítica CIMac™ pDNA. Análise da amostra de lisado tratada com 0,5M de CaCl₂.

Tabela 3. Avaliação da quantidade total de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação presentes na amostra de lisado tratada com 0,5M de CaCl₂, com base no método analítico [81].

Lisado tratado com 0,5M de CaCl₂	Quantidade total de DNA (µg)	Pureza (%)	Rendimento (%)
Amostra sem filtração	32,59	2,88	
Amostra filtrada	10,86	1,57	33,32

De acordo com os resultados das quantificações verificou-se que a pureza e quantidade de DNA recuperada é baixa. Assim, procedeu-se à otimização da concentração de CaCl₂ nos ensaios seguintes de forma a tentar obter melhores rendimentos de recuperação de DNA, diminuindo a concentração de CaCl₂ adicionada ao lisado para 0,4M. Além disso, foi realizada mais uma alteração no processo. A última centrifugação feita após a adição do CaCl₂ foi substituída por duas etapas de filtração, usando primeiro o filtro de 0,45µm (Sartolab® RF 150, 0,45µm, PES) e depois o de 0,22µm (Sartolab® BT 150, 0,22µm, PES). Para avaliar este processo, foram recolhidas amostras nas diferentes etapas para posterior análise por eletroforese em gel de agarose e na coluna analítica (Figura 15 e Tabela 4), nomeadamente antes e após cada filtração.

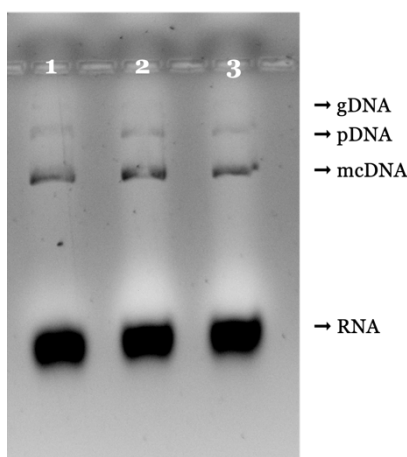


Figura 15. Eletroforese do lisado clarificado com 0,4M CaCl₂. 1 – Amostra inicial/não filtrada; 2 – Amostra filtrada com filtro de 0,45μm; 3 – Amostra filtrada com filtro de 0,45μm e 0,22μm.

Como se pode verificar pela Figura 15, a passagem pelos filtros faz com que haja uma perda de DNA (diminuição da intensidade das bandas correspondentes), mas a quantidade de RNA parece manter-se constante. No entanto, comparativamente com a amostra clarificada com 0,5M CaCl₂ (Figura 12 B) as bandas de DNA aparecem mais evidentes com a utilização de 0,4M CaCl₂, o que indica que esta concentração permite obter melhor recuperação de DNA.

Tal como com as amostras anteriores, estas foram injetadas na coluna analítica CIMac™ sendo os ensaios realizados nas mesmas condições descritas anteriormente. Os resultados destes ensaios encontram-se apresentados na Tabela 4 e, demonstram uma melhoria na quantidade de DNA recuperado em relação aos ensaios anteriores. Usando 0,4M de CaCl₂, na amostra que não passou pela filtração, a quantidade de DNA recuperado foi superior (44,80μg) do que na amostra com as mesmas condições, mas com a adição de 0,5M (32,59μg). Contudo, utilizar dois passos de filtração não se mostrou muito vantajoso, pois embora com o filtro de 0,45μm o grau de pureza tenha aumentado ligeiramente, a perda significativa de DNA em cada etapa de filtração não se mostrou benéfica e afeta significativamente a sua recuperação.

Tabela 4. Avaliação da quantidade total, percentagem de pureza e percentagem de recuperação presentes na amostra de lisado tratada com 0,4M de CaCl₂, com base no método analítico [81].

Lisado tratado com 0,4M de CaCl ₂	Quantidade total de DNA (µg)	Pureza do DNA (%)	Rendimento (%)
Amostra sem filtração	44,80	1,44	
Amostra filtrada com filtro 0,45 µm	29,20	2,15	65,18
Amostra filtrada com filtro 0,22µm	20,50	1,90	45,76

Assumiu-se assim, que os próximos ensaios devem ser realizados com a adição de 0,4M CaCl₂, sendo necessário realizar uma otimização do processo para aumentar o rendimento de recuperação de DNA das amostras filtradas.

4.1.1. Clarificação do lisado com CaCl₂ e DE

A DE é conhecida pelas suas propriedades como auxiliar de filtração de forma a permitir uma maior recuperação das biomoléculas alvo [85]. A DE foi cuidadosamente manuseada e utilizada de acordo com as instruções do fabricante. Basicamente, após a lise alcalina, adiciona-se o 0,4M CaCl₂ ao lisado e, quando este se encontra totalmente dissolvido, acrescenta-se diretamente a DE. O passo seguinte passa pela filtração direta desta mistura, a vácuo, com um filtro de 0,22µm de maior área superficial (Sartolab® BT 180C5, 0,22µm, PES) (Figura 16). Este novo processo usando a DE torna-se muito mais rápido (economiza cerca de 140 min) e simples para a obtenção da amostra de lisado simplificado comparativamente com o método tradicional, pois não implica passos de centrifugação, concentração e clarificação adicionais.

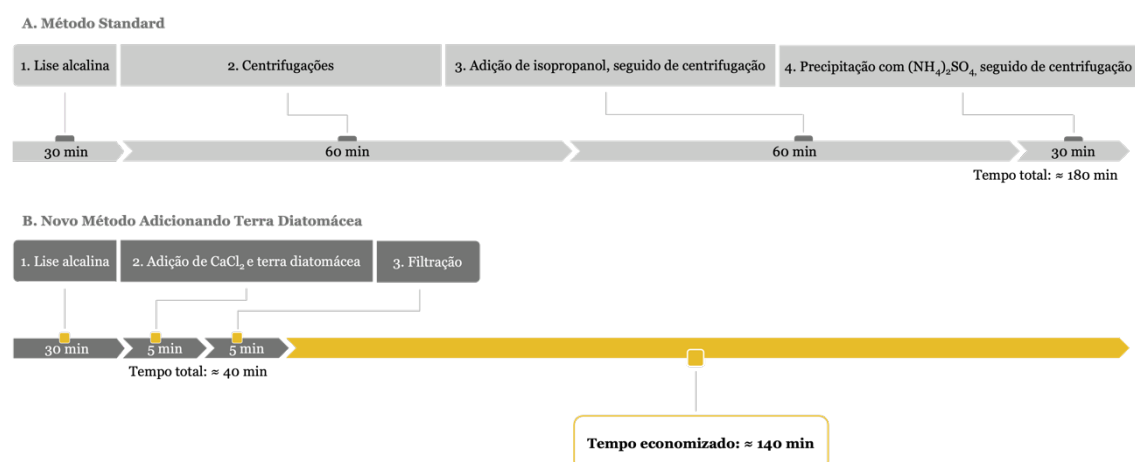


Figura 16. Representação esquemática de comparação dos dois métodos. A – Método convencional; B – Novo método adicionando DE. Adaptado de [85].

Para se perceber o efeito do CaCl_2 juntamente com a utilização da DE no lisado, foram preparadas duas amostras de lisado tratadas com DE, numa amostra foi adicionada 0,4M CaCl_2 e a mistura final foi filtrada e a outra amostra foi diretamente filtrada para eliminar todos os precipitados.

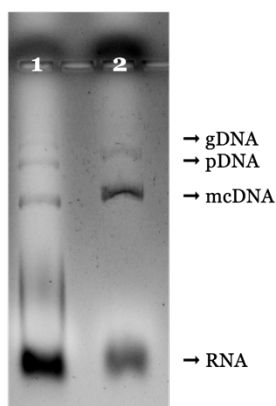


Figura 17. Eletroforese do lisado bruto tratado com DE. 1 – Lisado sem CaCl_2 ; 2 – Lisado com 0,4M CaCl_2 .

Analisando as bandas da eletroforese da Figura 17, podemos ver que a adição de 0,4M de CaCl_2 é vantajosa, visto que a amostra da linha 2 apresenta menos impurezas (no caso, ausência de gDNA e menor intensidade no RNA de baixo peso molecular, enquanto o de alto peso molecular parece inexistente).

Para comprovar a melhoria do processo ao implementar a DE, fez-se a quantificação da amostra de lisado tratada com 0,4M CaCl_2 e DE através da coluna analítica CIMac™. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, verificamos que a utilização de DE é benéfica pois comparativamente com o controlo (amostra com 0,4M CaCl_2 sem DE apresentada na Tabela 4) houve um aumento de 7 μg na recuperação. Percebe-se então que a incorporação da DE melhora o processo, tanto a nível de quantidade final de DNA como de tempo despendido tornando-se uma opção mais económica e sustentável.

Tabela 5. Avaliação da quantidade total de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação presentes na amostra de lisado tratada com 0,4 M de CaCl_2 e DE, com base no método analítico [81].

Lisado tratado com 0,4M de CaCl_2 e DE	Quantidade total de DNA (μg)	Pureza (%)	Rendimento (%)
Amostra sem filtração	44,80	1,54	
Amostra filtrada com filtro 0,22 μm	27,4	2,74	61,25

4.2. Ensaio com membrana Sartobind® Q75

Como os filtros não são capazes de fazer uma diferenciação de tamanhos das biomoléculas que ficam retidas ou que eluem, a amostra de lisado simplificada com a DE e filtro de 0,22µm necessita de uma purificação posterior para se obter o isolamento do DNA. Deste modo, a etapa final do processo foi realizada usando uma membrana adsorvente Sartobind® Q75 (MA Q75) de troca aniônica composta por grupos de amônia quaternária de maneira a remover as impurezas presentes na amostra. A membrana Q oferece vantagens significativas em relação às colunas cromatográficas convencionais nomeadamente: o tempo de processamento ser mais rápido; alta capacidade de ligação para grandes biomoléculas como o DNA; e o uso de tampão ser inferior [86].

Como descrito na literatura, na cromatografia de troca aniônica é típico acoplar ligandos fortes como as aminas quaternárias a matrizes poliméricas. Os ácidos nucleicos que apresentam carga negativa, interagem com esses grupos funcionais carregados positivamente e, a eluição ocorre com um gradiente crescente de sal que provoca o deslocamento dos diferentes ácidos nucleicos por ordem crescente de carga global e em função do comprimento da sua cadeia [87].

O lisado previamente tratado com 0,4M CaCl₂ e DE foi carregado diretamente na membrana. Foram feitos diversos estudos preliminares das condições de equilíbrio e eluição de maneira a explorar qual a melhor estratégia de eluição e isolamento do DNA no final. Em todos os ensaios, após o passo de equilíbrio, a amostra de lisado foi injetada recorrendo à bomba de amostra, e posteriormente foram iniciados os gradientes de eluição. Todos os ensaios foram realizados a uma taxa de fluxo de 1mL/min.

Os primeiros ensaios cromatográficos tiveram como objetivo encontrar as melhores condições de equilíbrio e carregamento de amostra para promover a eliminação direta do RNA no *flowthrough* (principalmente o de baixo peso molecular), visto que os grupos funcionais da membrana promovem interações mais fortes com o DNA (molécula de maiores dimensões e maior densidade de carga) do que com o RNA. Além disso, é importante salientar que quanto menor for a força iônica aplicada na fase de equilíbrio e aplicação de amostra, mais intensas podem ser as interações estabelecidas entre os ligandos carregados positivamente e os ácidos nucleicos [88]. Assim, no primeiro ensaio, realizou-se o equilíbrio da membrana com 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), efetuou-se o carregamento, a um fluxo de 1mL/min de 30 mL da amostra, controlando a condutividade ($\approx 42\text{mS/cm}$), seguido de uma etapa de lavagem com o tampão de equilíbrio e posteriormente foi aplicado um gradiente linear de 0M até 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0) durante 40 min. Por fim, para verificar que não ficou

nada retido na membrana, fez-se um passo de limpeza com 1,5M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), tendo por base a literatura [89]. Com este ensaio (Figura 18), podemos verificar que a maior parte do RNA presente na amostra de lisado não se ligou à membrana durante a etapa de carregamento, eluindo nas frações correspondentes a esta etapa (frações 1 e 2 da Figura 18). Em relação ao DNA, a maior parte é eluída no final do gradiente linear crescente de NaCl (pico 5 da Figura 18), mas existem perdas nos picos anteriores obtidos durante o gradiente. A eliminação do RNA logo no início do ensaio demonstra uma interação mais fraca com os ligandos carregados positivamente e, pode ser explicada pelo facto de que após a lise alcalina, os RNAs predominantes no lisado são de baixo peso molecular, apresentando assim menor densidade de carga que o DNA, o que resulta numa menor capacidade de interagir com a matriz [88]. Contudo, alguma quantidade de RNA (principalmente de alto peso molecular) ficou retida à membrana, tendo co-eluído com o DNA ao longo do ensaio.

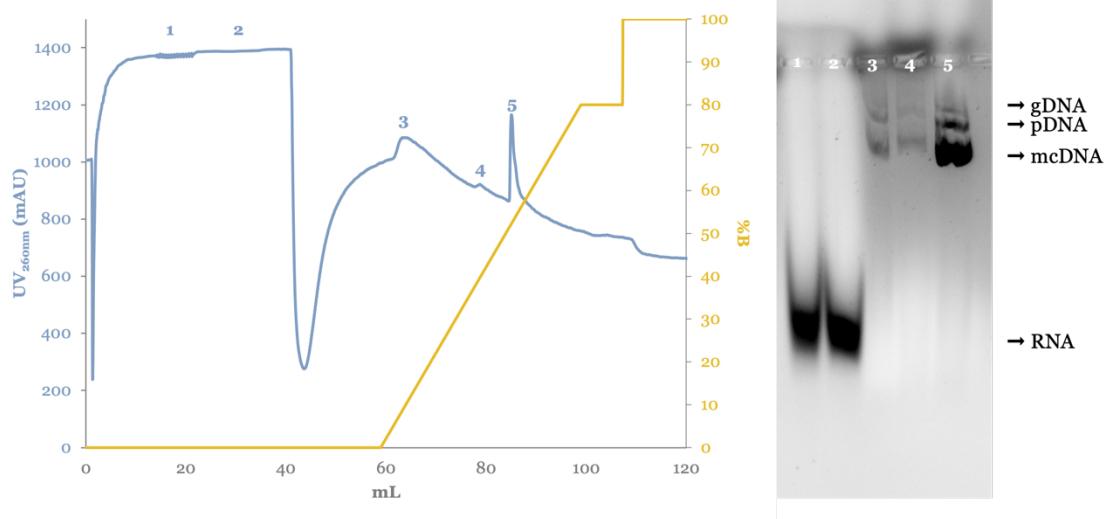


Figura 18. Perfil cromatográfico na MA Q75. Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; gradiente linear de 0M até 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 40 min); passo de 1,5M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respetiva eletroforese em gel de agarose; 1 a 5 – respetivos picos cromatográficos.

De maneira a melhorar a eliminação do RNA, adicionou-se 0,1M NaCl à amostra de lisado, com o objetivo de aumentar a condutividade e impedir a ligação de algumas moléculas de RNA (principalmente de alto peso molecular). Num primeiro ensaio (Figura 19 A), equilibrou-se a membrana com 0,5M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 e fez-se o carregamento de 30 mL de lisado a um fluxo de 1mL/min, onde se registou uma condutividade de aproximadamente 49mS/cm. Posteriormente, fez-se uma etapa de lavagem com o tampão de equilíbrio e iniciou-se um gradiente linear de 0,5M até 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0). No final, realizou-se um passo de lavagem

com 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0). Num segundo ensaio (Figura 19 B), as condições iniciais foram as mesmas, com o equilíbrio da coluna, carregamento da amostra e etapa de lavagem como descritas para o ensaio anterior. De seguida, efetuou-se um gradiente por passos, primeiro de 0,75M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0) e depois 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0). No entanto, verificou-se que a inclusão desta concentração de NaCl nas etapas de equilíbrio e carregamento foi demasiado elevada e fez com que houvesse uma perda de DNA nestas etapas (frações 1, 2 e 3 da Figura 19). Assim, decidiu-se manter as condições de equilíbrio e carregamento de amostra anteriores e explorar melhor as condições de eluição.

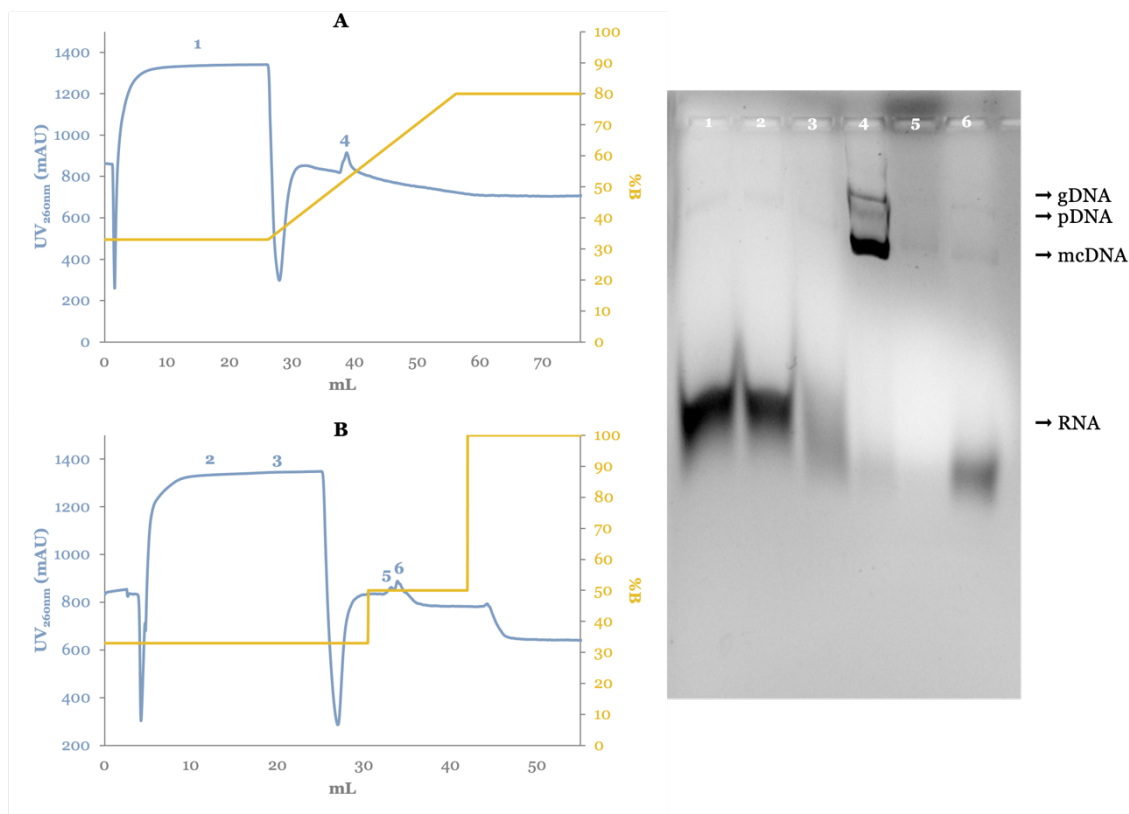


Figura 19. Perfil cromatográfico na MA Q75. A - Equilíbrio com 0,5M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 49mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; gradiente linear de 0,5M até 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 30 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. B - Equilíbrio com 0,5M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 49mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; passo de 0,75M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respetiva eletroforese em gel de agarose; 1 a 6 - respetivos picos cromatográficos.

No ensaio seguinte, a membrana foi então equilibrada com 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), carregou-se 30 mL de lisado a um fluxo de 1mL/min (condutividade \approx 42mS/cm) e efetuou-se uma etapa de lavagem com o mesmo tampão de equilíbrio. Seguiu-se um

passo de 0,6M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), um gradiente linear de 0,6M até 0,9M durante 30 min e por fim, um passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0). O primeiro passo permitiu a eliminação do RNA que se ligou à membrana (picos 2 e 3 da Figura 20). Apesar disso, este passo também provocou perdas de DNA antes de iniciado o gradiente linear, onde a maior parte da molécula alvo elui (pico 4 da Figura 20).

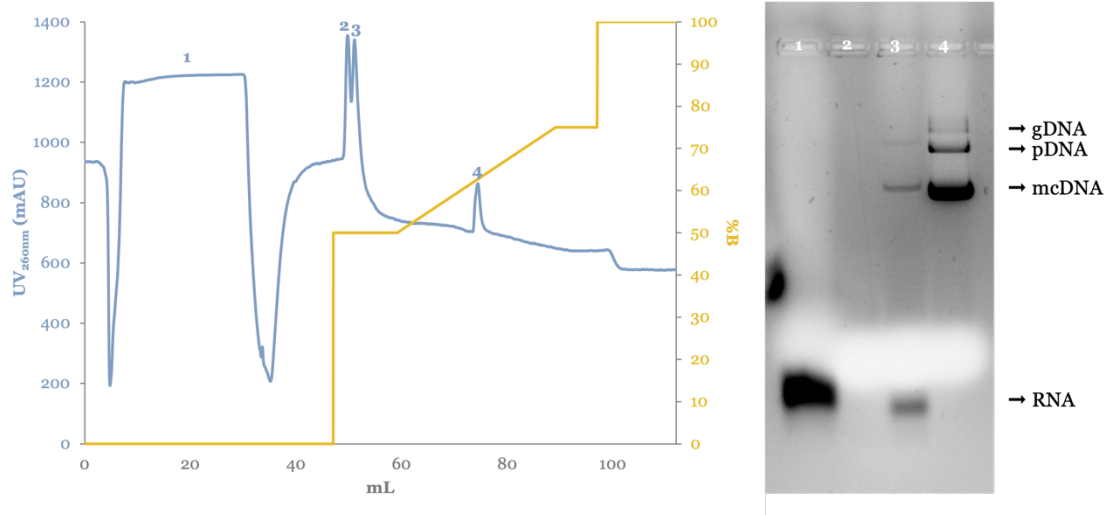


Figura 20. Perfil cromatográfico na MA Q75. Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; passo de 0,6M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; gradiente linear de 0,6M até 0,9M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 30 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 a 4 – respectivos picos cromatográficos.

Deste modo decidiu-se realizar um novo ensaio, com as mesmas condições de equilíbrio, carregamento da amostra e etapa de lavagem, mas diminuir a concentração de NaCl no primeiro passo para 0,564M NaCl, o que demonstrou evitar a perda do DNA (picos 2 e 3 da Figura 21). Contudo, o RNA mantém alguma ligação, co-eluinto apenas no passo seguinte com 0,84M NaCl, junto com a maior parte do DNA (pico 5 da Figura 21). Finalizou-se o ensaio com um passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (Figura 21).

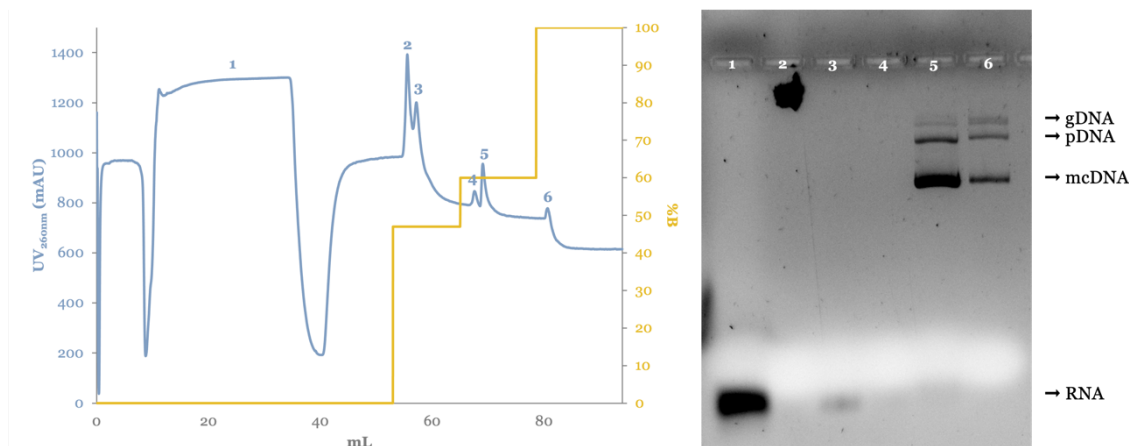


Figura 21. Perfil cromatográfico na MA Q75. Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; passo de 0,564M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; passo de 0,84M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 30 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respetiva eletroforese em gel de agarose; 1 a 6 – respetivos picos cromatográficos.

Ao fim dos ensaios descritos anteriormente, chegou-se a uma concentração de 0,588M NaCl no gradiente por passos que pareceu ideal para eliminar o RNA (picos 2 e 3 da Figura 22) e manter a ligação do DNA, que eluiu apenas no final do gradiente linear entre 0,588M e 0,744M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0) (pico 4 da Figura 22). Este ensaio mostrou que, a maioria das impurezas de RNA não se liga à membrana durante a etapa de carregamento e a que liga acaba por ser eliminada no passo de 0,588M de NaCl. Adicionalmente, devido ao aumento da força iónica do NaCl através do gradiente linear, a maior parte do DNA é eluída no final e obtém-se o seu isolamento no pico 4 da Figura 22. Ao avaliar o pico 4 deste ensaio, obteve-se o isolamento de DNA com uma pureza superior a 90% e uma recuperação de 74% (Tabela 6).

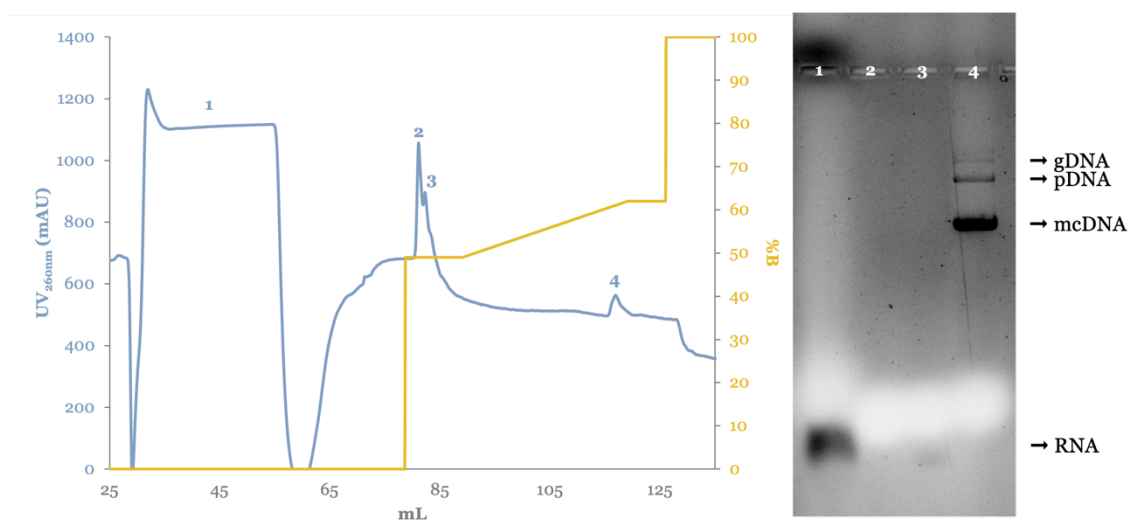


Figura 22. Perfil cromatográfico na MA Q75. Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; passo de

0,588M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; gradiente linear de 0,588M até 0,744M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 30 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respetiva eletroforese em gel de agarose; 1 – amostra do lisado tratada com 0,4M CaCl₂ e DE; 2 a 6 – respetivos picos cromatográficos.

Tabela 6. Avaliação da quantidade total de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação na amostra de lisado tratada com 0,4 M de CaCl₂ e DE, com base no método analítico [81].

Lisado tratado com 0,4M de CaCl₂ e DE	Quantidade total de DNA (µg)	Pureza (%)	Rendimento (%)
Amostra filtrada com filtro 0,22µm	27,44	2,74	
DNA purificado pela membrana Q75 (pico 5 da Figura 18)	21,79	43,75	79,41
DNA purificado pela membrana Q75 (pico 4 da Figura 20)	19,28	87,62	70,26
DNA purificado pela membrana Q75 (pico 4 da Figura 22)	20,3	91,95	74,0

4.3. Abordagem alternativa para validação do novo método

4.3.1. Extração modificada

De forma a complementar os estudos, evitar variações de resultados em função de lisados obtidos em dias diferentes e, ser possível uma comparação entre o método já existente de extração modificada e o abordado nesta dissertação (que envolve a clarificação do lisado com CaCl₂ e DE), foram feitos novos ensaios, a partir de um só *batch* de uma nova fermentação de grandes quantidades. Sendo assim, começou-se por preparar amostras das diferentes etapas da extração modificada.

Ao primeiro *pellet* (lisado A - resultante de 125 mL da nova fermentação) foram adicionados os três tampões de lise, seguindo-se as duas centrifugações. O sobrenadante resultante (\approx 30 mL) foi concentrado num concentrador de 10KDa e o tampão foi trocado para 200mM Tri-HCl, pH 8,0. No segundo *pellet* (lisado B - também resultante de 125 mL da nova fermentação), foram realizados os mesmos passos que no anterior, mas ao sobrenadante resultante das centrifugações foram adicionados 0,7 volumes de isopropanol. Foi incubado por 30 min em gelo e centrifugado a 16000g, por 30 min, a 4°C. O *pellet* resultante foi ressuspenso em 1 mL de 10mM de Tris-EDTA, pH 8,0. De seguida, adicionou-se sulfato de amónio para uma concentração de 2,5M, agitando-se suavemente e incubou-se em gelo, por 15 min. Por último, foi feita a centrifugação a 16000g, durante 20 min a 4°C e recuperou-se o sobrenadante. Este foi dessalinizado num concentrador de 10KDa, passando a ficar em tampão 200mM Tris-HCl (pH 8,0).

Este estudo teve como objetivo verificar o que acontece ao longo do processo convencional, ou seja, comparar a constituição da amostra de lisado inicial logo após a lise celular (lisado A da Figura 23) com a amostra de lisado concentrada com isopropanol e clarificada com sulfato de amônio (lisado B da Figura 23).

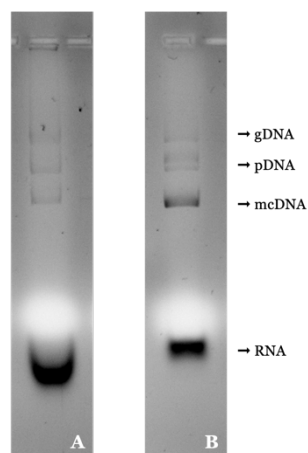


Figura 23. Eletroforese das amostras de lisado. A – lisado A; B- lisado B.

Após a preparação das amostras, foram feitas as quantificações do DNA, utilizando novamente o método analítico modificado na coluna analítica CIMac™ pDNA, previamente descrito por Sousa e colaboradores [81].

Tabela 7. Avaliação da concentração de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação nas amostras das etapas da extração modificada, com base no método analítico [81].

Etapas da extração modificada	Concentração de DNA (µg/mL)	Pureza do DNA (%)	Rendimento (%)
Lisado A	163,67	1,28	
Lisado B	137,51	5,71	84,02

Como os dados da Tabela 7 indicam, durante o processo de extração modificada (tratamento convencional), apesar da perda de alguma quantidade de DNA, a pureza da amostra aumenta devido ao passo de adição de sulfato de amônio que leva à remoção de impurezas como o RNA de alto peso molecular e proteínas [88].

4.3.2. Clarificação do lisado com CaCl₂

Tal como foi feito anteriormente, para favorecer a remoção de impurezas, foi feita a clarificação do lisado através da adição de CaCl₂. Desta vez, já tendo em conta os ensaios feitos anteriormente, optou-se por três concentrações diferentes de CaCl₂: 0,25M, 0,4M e 0,5M. As amostras foram analisadas com e sem filtração num filtro novo de 0,22µm

(Sartolab® BT 150, 0,22 µm, PES). Em seguida, a etapa de lavagem da superfície do filtro foi adicionada para recuperar o que ficou retido neste.

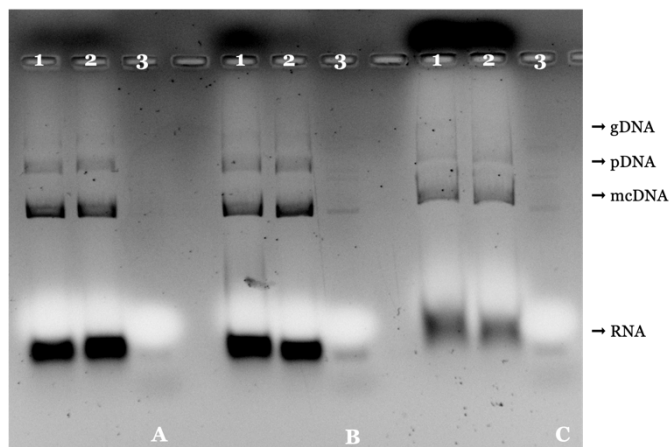


Figura 24. Influência do CaCl₂ na remoção de impurezas. Eletroforese das amostras de lisados clarificados com diferentes concentrações de CaCl₂: A – 0,25M; B – 0,4M; C – 0,5M. 1 – Amostra inicial/não filtrada; 2 – Amostra Filtrada; 3 – Amostra Retida.

Voltou a verificar-se pela eletroforese da Figura 24 que, apesar da concentração mais baixa apresentar uma banda de DNA mais evidente, não ajuda na eliminação das impurezas como o RNA. E da mesma forma que nos ensaios apresentados no ponto 4.1., a concentração de 0,5M CaCl₂ elimina uma maior quantidade de RNA, mas também há uma perda evidente de DNA. Assim, e de acordo com a tendência observada anteriormente com outra amostra de lisado tratada com 0,4M de CaCl₂, comprovou-se que a adição desta concentração é a mais vantajosa.

4.3.3. Clarificação do lisado com CaCl₂ e DE

Uma nova amostra de lisado foi tratada com 0,4M de CaCl₂ e nova DE, representada na Figura 25. A amostra foi filtrada num filtro novo de 0,22µm (Sartolab® BT 180C5, 0,22µm, PES).

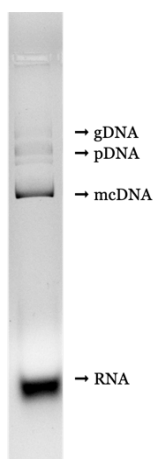


Figura 25. Eletroforese do lisado bruto tratado com 0,4M CaCl₂ e DE.

Tabela 8. Avaliação da concentração de DNA, percentagem de pureza e percentagem de recuperação na amostra de lisado tratada com 0,4 M de CaCl₂ e DE, com base no método analítico [81].

Lisado tratado com 0,4M de CaCl₂ e DE	Concentração de DNA (µg/mL)	Pureza do DNA (%)	Rendimento (%)
Amostra sem filtração	98,19	3,95	
Amostra filtrada com filtro 0,22µm	75,15	3,45	76,54

Através das quantificações na coluna analítica CIMac™ podemos perceber que, comparando a amostra em que é adicionado o 0,4M CaCl₂ e a DE, com a amostra inicial que apenas é tratada com 0,4M CaCl₂ e não passa pelo processo de filtração, o rendimento obtido é cerca de 76%. Este resultado indica que há uma pequena perda de DNA que pode ficar agarrado nos precipitados junto com a DE ou no próprio filtro.

Comparativamente ao método da extração modificada (resultados apresentados na Tabela 7), em que no final se recupera cerca de 84% do DNA, este novo método apresenta uma diminuição de rendimento semelhante (Tabela 8). Agregando estes resultados, ao facto de que o simples tratamento do lisado bruto com adição de 0,4M CaCl₂ e DE tornar o processo mais simples e rápido quando comparado com o tratamento do lisado com isopropanol e sulfato de amónio que obriga à adição de várias etapas de centrifugação. Além disso, este novo processo requer concentrações de CaCl₂ muito inferiores às necessárias de sulfato de amónio o que também é muito vantajoso do ponto de vista industrial, tornando o processo mais ecológico e económico [75].

Relativamente à pureza do DNA, apesar de ser mais baixa, como se pode aplicar o lisado bruto tratado com 0,4M CaCl₂ e DE nas membranas adsorventes, torna o passo da purificação mais rápido em relação aos métodos já estabelecidos [85].

4.4. Ensaios com membrana Sartobind® Q75 e membrana Sartobind® D75

Foram feitos vários ensaios em duas membranas, caracterizadas como membranas de troca iónica forte e fraca, usando amostras de lisado do mesmo *batch* referido anteriormente de forma a podermos comparar os resultados obtidos ao longo do processo. A membrana adsorvente Sartobind® D75 tem imobilizado ligandos dietilamina, o que faz com que seja uma membrana de troca aniónica fraca e, a Sartobind® Q75 tem imobilizados grupo de amónia quaternária, como referido

anteriormente no ponto 4.2 [86]. Com a membrana D75, espera-se que também o ligando amina polimérico (dietilamina) que é carregado positivamente, estabeleça interações eletrostáticas com os grupos fosfato presentes no DNA carregado negativamente, à semelhança do que já foi descrito anteriormente [39].

Assim sendo, amostras de lisado do mesmo *batch* foram tratadas com 0,4M CaCl₂ e DE, e carregadas diretamente nas membranas. Com base nas condições de equilíbrio e eluição já otimizadas no ponto 4.2. para a membrana Q75, fizeram-se novos ensaios para isolamento do DNA. Resumidamente, as membranas foram equilibradas com tampão 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 e após o carregamento da amostra com a bomba para injeção do lisado (controlando a condutividade que em todos os ensaios foi de \approx 42mS/cm), seguiu-se uma etapa de lavagem com o mesmo tampão de equilíbrio e posteriormente os respectivos gradientes. Todos os ensaios decorreram a uma taxa de fluxo de 1mL/min. Os ensaios A, B e C, representados na Figura 26, foram realizados na membrana Q75, enquanto os ensaios D, E e F foram feitos na membrana D75 (Figura 27).

No ensaio A (Figura 26 A), após a etapa de lavagem com o tampão 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), seguiu-se um passo de 0,588M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0) onde foi eliminada RNA, principalmente de baixo peso molecular (pico 2 e 3 da Figura 26 A). Posteriormente iniciou-se um gradiente linear de 0,588M até 0,744M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH8,0 (durante 30 min), e por fim um passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH8,0). Durante o gradiente linear, o restante RNA foi eliminado, no entanto também houve perdas de DNA (pico 4 Figura da 26 A). O isolamento do DNA foi alcançado no último passo, no máximo da força iônica aplicada (pico 5 da Figura 26 A).

De maneira a que não houvessem perdas de DNA optou-se por um novo ensaio, onde apenas se alterou o gradiente linear, passando a ser de 0,588M até 0,756M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), em 30 min. Este passo já favoreceu a eliminação de RNA de alto peso molecular (pico 5 da Figura 26 B) e o isolamento do DNA que eluiu no final do gradiente (pico 6 da Figura 26 B).

Fez-se ainda outro ensaio, também com mudança apenas do gradiente linear, sendo este iniciado em 0,588M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0) e aumentando a força iônica até 0,750M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), durante 30 min. No entanto, apesar da eliminação do RNA (pico 4 da Figura 26 C), houve perdas de DNA durante o gradiente linear (pico 5 da Figura 26 C).

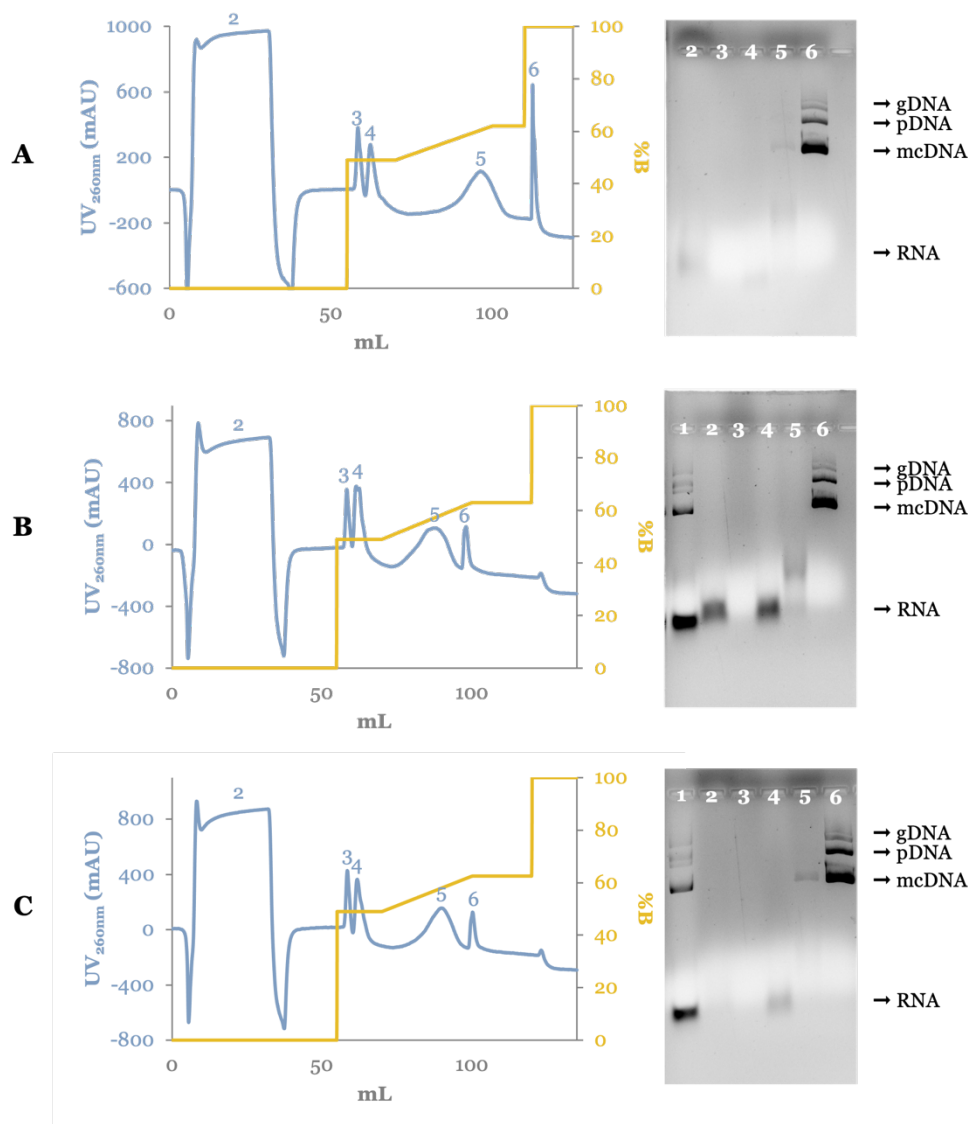


Figura 26. Perfis cromatográficos dos ensaios na MA Q75; A – Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; passo de 0,588M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; gradiente linear de 0,588M até 0,744M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 30 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 2 a 6 – respectivos picos cromatográficos; B – Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; passo de 0,588M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; gradiente linear de 0,588M a 0,756M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 30 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 – amostra do lisado tratada com 0,4M CaCl_2 e DE; 2 a 6 – respectivos picos cromatográficos; C – Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; passo de 0,588M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; gradiente linear de 0,588M a 0,750M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 30 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respectiva eletroforese em gel de agarose; 1 – amostra do lisado tratada com 0,4M CaCl_2 e DE; 2 a 6 – respectivos picos cromatográficos.

Um primeiro ensaio realizado na membrana D75 (Figura 27 D) consistiu, após o equilíbrio, no carregamento da amostra e etapa de lavagem como descrito anteriormente, num gradiente linear de 0M até 0,996M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0) durante 40 min. Este gradiente não foi benéfico pois no pico 5 da Figura 27 D, apesar de eliminar RNA ocorre a perda de algum DNA, que é eliminado na sua maioria no final do gradiente (pico 6 da Figura 27 D).

Assim, de maneira a que não houvessem perdas de DNA, mudou-se de estratégia, iniciando um outro ensaio com um passo de 0,564M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0). Este primeiro passo permitiu a eliminação do RNA (picos 3 e 4 da Figura 27 E), enquanto o DNA eluiu isolado (pico 6 da Figura 27 E) no final do gradiente linear aplicado a seguir durante 30 min, de 0,564M a 0,720M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0). Terminou-se o ensaio com um passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0).

Num terceiro ensaio, aumentou-se a força iônica aplicada no primeiro passo para 0,588M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0) que eliminou o RNA que se liga à coluna no passo de carregamento da amostra (picos 3 e 4 da Figura 27 F). De seguida iniciou-se um gradiente linear em 30 min de 0,588M até 0,756M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), onde o DNA eluiu isolado no final (pico 6 da Figura 27 F). O último passo aplicado para verificar que nada ficou retido na membrana foi aplicado foi de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0).

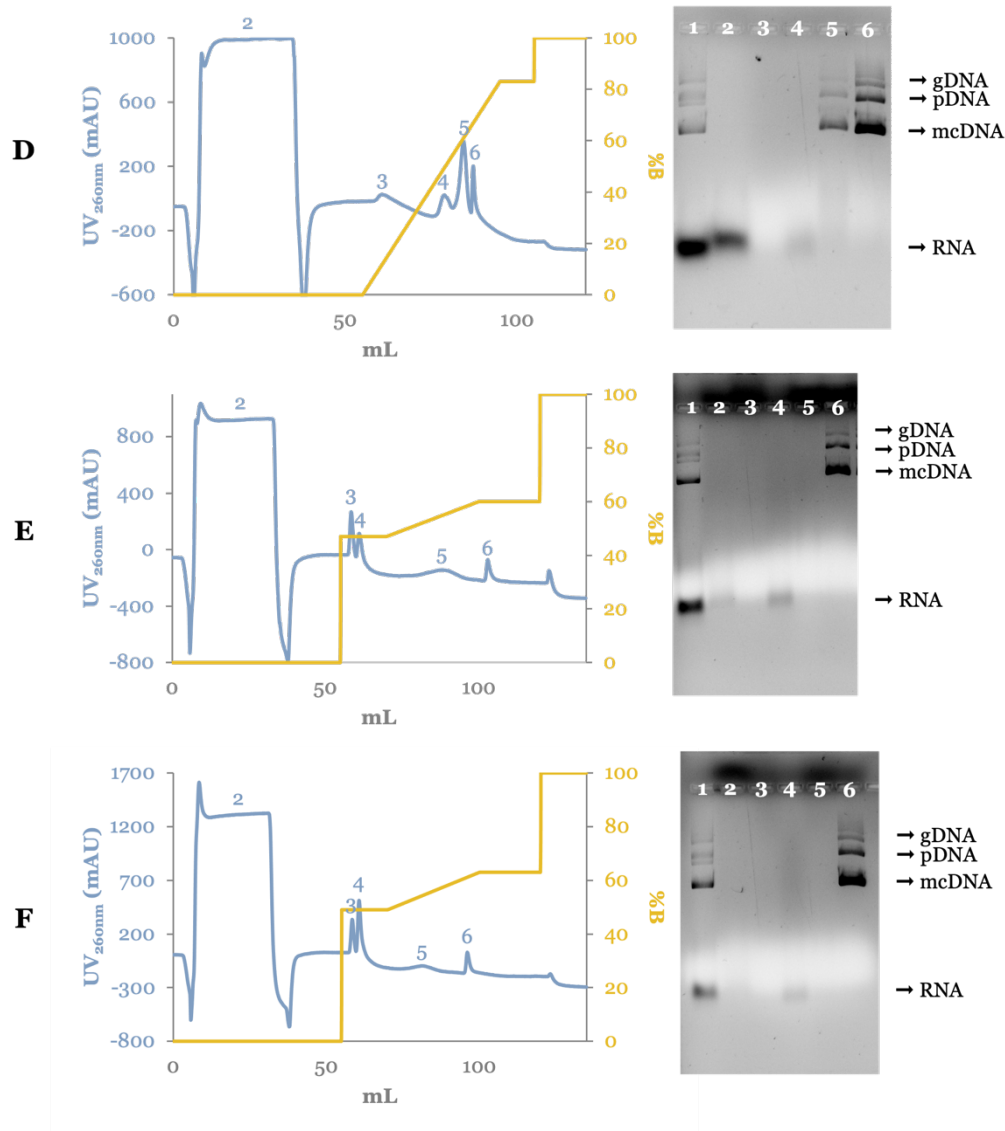


Figura 27. Perfis cromatográficos dos ensaios na MA Q75; D – Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; gradiente linear de 0M até 0,996M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 40 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respetiva eletroforese em gel de agarose; 1 – amostra do lisado tratada com 0,4M CaCl_2 e DE; 2 a 6 – respetivos picos cromatográficos; E – Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; passo de 0,564M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 gradiente linear de 0,564M até 0,720M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 30 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respetiva eletroforese em gel de agarose; 1 – amostra do lisado tratada com 0,4M CaCl_2 e DE; 2 a 6 – respetivos picos cromatográficos; F – Equilíbrio com 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0; carregamento de 30 mL de lisado (Condutividade \approx 42mS/cm); etapa de lavagem com tampão de equilíbrio; passo de 0,588M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 gradiente linear de 0,588M até 0,756M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0 (durante 30 min); passo de 1,2M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0. Representação da respetiva eletroforese em gel de agarose; 1 – amostra do lisado tratada com 0,4M CaCl_2 e DE; 2 a 6 – respetivos picos cromatográficos.

4.4.1. Análise das amostras purificadas por densitometria de bandas

Infelizmente a coluna analítica CIMac™ perdeu a capacidade de quantificar o DNA presente nas amostras de lisado, dado o elevado número de utilizações e tempo de meia vida da coluna já ter sido ultrapassado há muito tempo. Mesmo após a realização de vários procedimentos de regeneração, os resultados provenientes desta coluna deixaram de ser reprodutíveis, o que nos forçou a procurar uma alternativa para poder avaliar os resultados dos ensaios com as membranas, uma vez que a compra de uma nova coluna neste momento também não é viável por falta de verba. Assim sendo, as amostras obtidas pela estratégia cromatográfica de troca aniónica realizada nas membranas adsorventes Q e D, foram avaliadas por densitometria de bandas de um gel de agarose, utilizando o *software* Image J. Na Figura 28 encontra-se a eletroforese em gel de agarose de todas as frações de DNA purificadas nas membranas Q e D, através da cromatografia de troca aniónica.

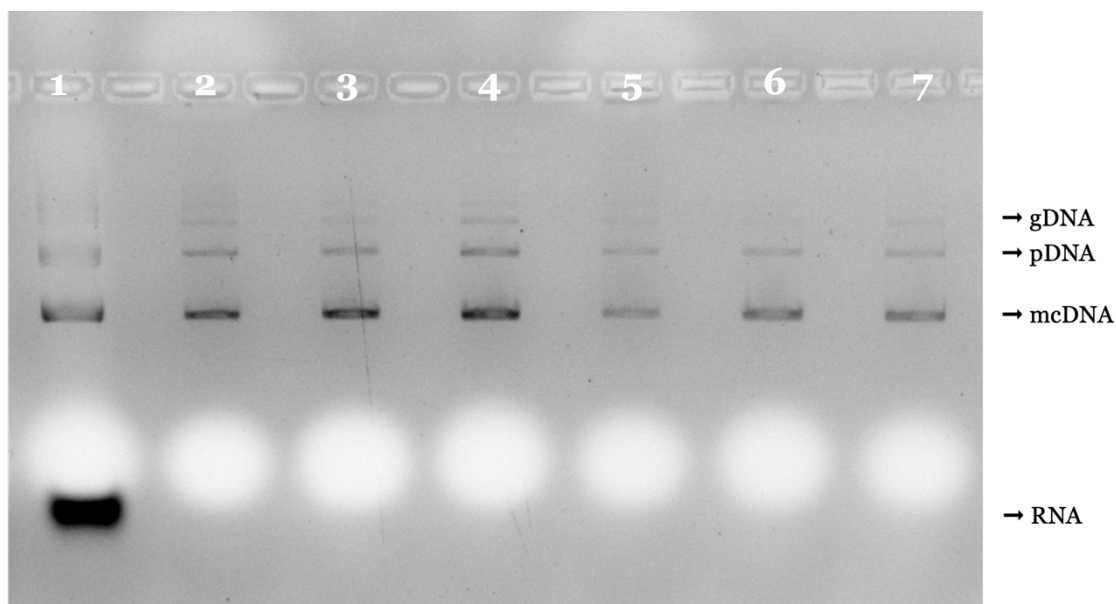


Figura 28. Eletroforese das amostras de DNA tratadas com 0,4M CaCl₂ e DE, após purificação com as membranas de cromatografia de troca aniónica. 1- Lisado bruto tratado com 0,4M CaCl₂ e DE; 2 a 4 – ensaios na MA Q75; 5 a 7 – ensaios na MA D75.

Através do programa é possível avaliar a densidade relativa das bandas de DNA e RNA. Com esses dados calculou-se a razão entre a densidade relativa da banda correspondente ao DNA e a densidade relativa da banda correspondente ao RNA para a determinação da pureza. O cálculo da percentagem de recuperação de DNA fez-se através da comparação da área de DNA da amostra avaliada com a área de DNA da amostra de lisado tratada com 0,4M CaCl₂ e DE (que corresponde ao lisado que é injetado diretamente nas membranas).

Tabela 9. Cálculo da pureza do DNA da amostra de lisado tratada com 0,4 M de CaCl₂ e DE, e cálculo da pureza e rendimento das amostras purificadas nas membranas MA Q75 e MA D75 (cromatogramas da Figura 26 e 27), através do *software* Image J.

	Pureza do DNA (%)	Rendimento (%)
Lisado tratado com 0,4M de CaCl₂ e DE	37,07	
MA Q75 (A)	>99	66,24
MA Q75 (B)	>99	89,58
MA Q75 (C)	>99	≈ 100
MA D75 (D)	>99	26,64
MA D75 (E)	>99	52,60
MA D75 (F)	>99	47,04

Observando a eletroforese da Figura 28, podemos inferir que as amostras recuperadas pelas membranas não apresentam contaminação por RNA, sendo ausente a sua banda na eletroforese. Isto é comprovado pelos cálculos através do *software*, onde confirmamos que não se deteta RNA, sendo assim a pureza apresentada >99% em todos os ensaios feitos.

Como relatado na literatura, embora para purificação de proteínas, a principal diferença entre as membranas de troca aniónica forte e fraca é a sua capacidade de ligação, com o ligando fraco a apresentar uma capacidade de ligação inferior [86]. Esta característica resulta numa menor recuperação do DNA, como é evidenciado pela comparação dos valores de recuperação nas duas membranas. Pelos valores indicados na Tabela 9, concluímos que a MA Q75 com o ligando amónia quaternária (ligando forte) obteve recuperações da quantidade de DNA boas, sendo sempre o rendimento superior a 60%. O melhor ensaio apresenta uma recuperação quase total do DNA. Já a membrana com o ligando fraco, apresentou valores de recuperação por volta dos 40% a 50% o que não é tão satisfatório. Será assim necessário fazer melhoramentos nas condições utilizadas nesta membrana.

Concluímos então que as duas membranas estão aptas para fazer a purificação do DNA, após a aplicação do lisado clarificado com 0,4M CaCl₂ e DE.

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas futuras

Considerando a elevada prevalência de infeções por HPV e o crescente número de casos de CCU com o passar dos anos, é necessário adotar estratégias eficazes para esta doença. A terapia génica tem ganho importância na comunidade científica, surgindo o vetor de mcDNA para entrega de genes alvo, como uma alternativa promissora relativamente ao pDNA.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção e purificação de um vetor de mcDNA que codifica o gene pri-miR-375, para futuramente ser utilizado em terapia génica do CCU. No entanto, o processo de obtenção de um biofármaco representa um alto custo para a indústria farmacêutica e tem um impacto ambiental alto associado à utilização de elevadas quantidades de sais caotópicos e solventes orgânicos. Com isto, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas. Assim, neste trabalho foi explorada uma nova estratégia de purificação de DNA de lisados brutos de *E. coli* aplicando DE combinada com purificação por membranas adsorventes de cromatografia de troca aniónica.

De maneira a eliminar várias etapas do processo biotecnológico como a concentração com isopropanol, a clarificação com sulfato de amónio e as centrifugações, que são desvantajosas e demoradas, começou-se por verificar qual a concentração de CaCl_2 que seria mais adequada para simplificar os lisados. Concluiu-se que 0,4M CaCl_2 foi a concentração que eliminava uma maior quantidade de contaminantes sem comprometer a quantidade de DNA recuperado. Após essa primeira otimização do processo, testaram-se filtros para a separação das biomoléculas mas, concluiu-se que estes não faziam uma distinção dos componentes do lisado aquando da filtração, deixando passar e retendo de igual forma qualquer ácido nucleico.

Assim, de maneira a ser possível uma filtração direta do lisado após a lise alcalina e que promovesse a remoção de detritos celulares e impurezas precipitadas resultantes deste passo e sem recorrer a centrifugações, adicionou-se DE à mistura. Os resultados associados a esta experiência demonstraram que a DE ajuda na filtração, evitando o entupimento do filtro e obtendo-se uma amostra de lisado simplificado e sem perdas significativas de DNA.

Apesar da remoção de algumas impurezas, foi necessária uma segunda etapa, onde se recorreu à purificação por membranas adsorventes de cromatografia de troca iónica. Pelos estudos feitos das condições de equilíbrio e eluição, concluímos que a eliminação

da maior parte do RNA ocorre durante a etapa de carregamento do lisado, feita com tampão Tris-EDTA (10mM Tris, 0,1M EDTA, pH 8,0). Na membrana Q75, os diferentes gradientes testados, levaram a uma boa purificação do DNA, com eliminação das impurezas ao longo do ensaio. Com esta membrana, aplicando primeiro um passo de 0,588M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), seguido de um gradiente linear até 0,750M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), foi possível obter uma recuperação quase total do DNA ($\approx 100\%$) juntamente com o alcance de uma pureza superior a 99%. Já na membrana D75 (onde foram aplicados gradientes semelhantes aos aplicados na membrana Q75), os resultados não foram tão promissores. O melhor ensaio com esta membrana, onde se aplicou um passo de 0,564M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0) e posteriormente um gradiente linear até 0,720M NaCl em 10mM Tris, 0,1M EDTA (pH 8,0), permitiu apesar de com uma pureza superior a 99%, uma recuperação do DNA total de apenas 52,60%.

Concluindo, a melhor estratégia de purificação encontrada para recuperação e purificação do DNA é a clarificação do lisado com 0,4M CaCl_2 e DE, seguida de um ensaio na membrana adsorvente Sartobind[®] Q75.

No geral, os estudos realizados demonstraram a eficiência da estratégia combinada. No entanto, ainda é necessário realizar mais alguns estudos, principalmente na membrana D75, para melhorar o isolamento e o rendimento máximo do vetor mcDNA recuperado. Também será necessário fazer uma avaliação mais analítica das amostras purificadas pelas membranas para comprovar os resultados obtidos, assim como a determinação do conteúdo de impurezas como proteínas, gDNA e endotoxinas para verificar se estão de acordo com os requisitos das agências reguladoras. Assim, espera-se que esta estratégia combinada possa ser ampliada e aplicada com sucesso na indústria biofarmacêutica para purificar vetores de DNA de forma rápida e econômica.

Capítulo 6 – Referências

- [1] B.S. Chhikara, K. Parang, Chemical Biology LETTERS Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis, Chem. Biol. Lett. Chem. Biol. Lett. 2023 (2022) 451. <https://pubs.thesciencein.org/cbl>.
- [2] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, CA. Cancer J. Clin. 71 (2021) 209–249. doi:10.3322/caac.21660.
- [3] M.M. Fidler, F. Bray, I. Soerjomataram, The global cancer burden and human development: A review, Scand. J. Public Health. 46 (2018) 27–36. doi:10.1177/1403494817715400.
- [4] D. Stelzle, L.F. Tanaka, K.K. Lee, A. Ibrahim Khalil, I. Baussano, A.S.V. Shah, D.A. McAllister, S.L. Gottlieb, S.J. Klug, A.S. Winkler, F. Bray, R. Baggaley, G.M. Clifford, N. Broutet, S. Dalal, Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV, Lancet Glob. Heal. 9 (2021) e161–e169. doi:10.1016/S2214-109X(20)30459-9.
- [5] S.L. Bedell, L.S. Goldstein, A.R. Goldstein, A.T. Goldstein, Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future, Sex. Med. Rev. 8 (2020) 28–37. doi:10.1016/j.sxmr.2019.09.005.
- [6] C.K. Chan, G. Aimagambetova, T. Ukybassova, K. Kongrtay, A. Azizan, Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination - Review of Current Perspectives, J. Oncol. 2019 (2019). doi:10.1155/2019/3257939.
- [7] C.S. Sultana, Human Papilloma Virus Vaccine for Cervical Cancer Prevention, J. Bangladesh Coll. Physicians Surg. 39 (2021) 123–131. doi:10.3329/jbcps.v39i2.52392.
- [8] K.S. Okunade, Human papillomavirus and cervical cancer, J. Obstet. Gynaecol. (Lahore). 40 (2020) 602–608. doi:10.1080/01443615.2019.1634030.
- [9] M. Schiffman, J. Doorbar, N. Wentzensen, S. De Sanjosé, C. Fakhry, B.J. Monk, M.A. Stanley, S. Franceschi, Carcinogenic human papillomavirus infection, Nat. Rev. Dis. Prim. 2 (2016). doi:10.1038/nrdp.2016.86.
- [10] D. Viarisis, L. Gissmann, M. Tommasino, Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models, Curr. Opin. Virol. 26 (2017)

- 56–62. doi:10.1016/j.coviro.2017.07.014.
- [11] S. V. Graham, The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review, *Clin. Sci.* 131 (2017) 2201–2221. doi:10.1042/CS20160786.
- [12] M.E. Harden, K. Munger, Human papillomavirus molecular biology, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 772 (2017) 3–12. doi:10.1016/j.mrrev.2016.07.002.
- [13] J. Doorbar, N. Egawa, H. Grif, C. Kranjec, Doorbar_et_al-2015-Reviews_in_Medical_Virology, (2015) 2–23. doi:10.1002/rmv.
- [14] M. Mac, C.A. Moody, Epigenetic regulation of the human papillomavirus life cycle, *Pathogens.* 9 (2020) 1–18. doi:10.3390/pathogens9060483.
- [15] K. Hoppe-Seyler, F. Bossler, J.A. Braun, A.L. Herrmann, F. Hoppe-Seyler, The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets, *Trends Microbiol.* 26 (2018) 158–168. doi:10.1016/j.tim.2017.07.007.
- [16] A.M. Almeida, J.A. Queiroz, F. Sousa, Â. Sousa, Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins, *Drug Discov. Today.* 24 (2019) 2044–2057. doi:10.1016/j.drudis.2019.07.011.
- [17] M. Estanqueiro, M.H. Amaral, J. Conceição, J.M. Sousa Lobo, Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 126 (2015) 631–648. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.12.041.
- [18] N.A. Alhakamy, D.T. Curiel, C.J. Berkland, The era of gene therapy: From preclinical development to clinical application, *Drug Discov. Today.* 26 (2021) 1602–1619. doi:10.1016/j.drudis.2021.03.021.
- [19] X.M. Anguela, K.A. High, Entering the modern era of gene therapy, *Annu. Rev. Med.* 70 (2019) 273–288. doi:10.1146/annurev-med-012017-043332.
- [20] W. Wang, W. Li, N. Ma, G. Steinhoff, Non-Viral Gene Delivery Methods, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 14 (2013) 46–60. doi:10.2174/138920113804805278.
- [21] Á. Áyen, Y.J. Martínez, H. Boulaiz, Targeted gene delivery therapies for cervical cancer, *Cancers (Basel).* 12 (2020). doi:10.3390/cancers12051301.
- [22] M.L. Tornesello, R. Faraonio, L. Buonaguro, C. Annunziata, N. Starita, A. Cerasuolo, F. Pezzuto, A.L. Tornesello, F.M. Buonaguro, The Role of microRNAs, Long Non-coding RNAs, and Circular RNAs in Cervical Cancer, *Front. Oncol.* 10 (2020). doi:10.3389/fonc.2020.00150.
- [23] T. Mitra, S. Elangovan, Cervical cancer development, chemoresistance, and

- therapy: a snapshot of involvement of microRNA, *Mol. Cell. Biochem.* 476 (2021) 4363–4385. doi:10.1007/s11010-021-04249-4.
- [24] T. Treiber, N. Treiber, G. Meister, Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20 (2019) 5–20. doi:10.1038/s41580-018-0059-1.
- [25] A.L. Leitão, F.J. Enguita, A Structural View of miRNA Biogenesis and Function, *Non-Coding RNA.* 8 (2022). doi:10.3390/ncrna8010010.
- [26] J. Hanna, G.S. Hossain, J. Kocerha, The potential for microRNA therapeutics and clinical research, *Front. Genet.* 10 (2019). doi:10.3389/fgene.2019.00478.
- [27] F. Ding, J. Liu, X. Zhang, microRNA-375 released from extracellular vesicles of bone marrow mesenchymal stem cells exerts anti-oncogenic effects against cervical cancer, *Stem Cell Res. Ther.* 11 (2020) 1–16. doi:10.1186/s13287-020-01908-z.
- [28] X. Yu, W. Zhao, X. Yang, Z. Wang, M. Hao, MiR-375 Affects the Proliferation, Invasion, and Apoptosis of HPV16-Positive Human Cervical Cancer Cells by Targeting IGF-1R, *Int. J. Gynecol. Cancer.* 26 (2016) 851–858. doi:10.1097/IGC.0000000000000711.
- [29] Y. Hu, Y. Ma, G. Luo, W. Liao, S. Zhang, G. Li, Effect of MiR-375 Regulates YAP1 on the Invasion, Apoptosis, and Epithelial-Mesenchymal Transition of Cervical Cancer HeLa Cells, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2021 (2021). doi:10.1155/2021/3088723.
- [30] F. Wang, Y. Li, J. Zhou, J. Xu, C. Peng, F. Ye, Y. Shen, W. Lu, X. Wan, X. Xie, MiR-375 is down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1, *Am. J. Pathol.* 179 (2011) 2580–2588. doi:10.1016/j.ajpath.2011.07.037.
- [31] H.M. Jung, B.L. Phillips, E.K.L. Chan, MiR-375 activates p21 and suppresses telomerase activity by coordinately regulating HPV E6/E7, E6AP, CIP2A, and 14-3-3 ζ , *Mol. Cancer.* 13 (2014). doi:10.1186/1476-4598-13-80.
- [32] H. Lu, Z. Qi, L. Lin, L. Ma, L. Li, H. Zhang, L. Feng, Y. Su, The E6-TAp63 β -Dicer feedback loop involves in miR-375 downregulation and epithelial-to-mesenchymal transition in HR-HPV+ cervical cancer cells, *Tumor Biol.* 37 (2016) 15805–15811. doi:10.1007/s13277-016-5378-2.
- [33] H. Zhao, X. Jin, H. Su, X. Deng, Y. Fang, L. Shen, C. Xie, Down-regulation of Dicer expression in cervical cancer tissues, *Med. Oncol.* 31 (2014). doi:10.1007/s12032-014-0937-0.

- [34] A. Abdulrahman, A. Ghanem, Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review, *Anal. Chim. Acta.* 1025 (2018) 41–57. doi:10.1016/j.aca.2018.04.001.
- [35] P. Mayrhofer, M. Schleef, W. Jechlinger, Use of minicircle plasmids for gene therapy, *Methods Mol. Biol.* 542 (2009) 87–104. doi:10.1007/978-1-59745-561-9_4.
- [36] A.M. Almeida, D. Eusébio, J.A. Queiroz, F. Sousa, A. Sousa, The use of size-exclusion chromatography in the isolation of supercoiled minicircle DNA from *Escherichia coli* lysate, *J. Chromatogr. A.* 1609 (2020). doi:10.1016/j.chroma.2019.460444.
- [37] V.M. Gaspar, C.J. Maia, J.A. Queiroz, C. Pichon, I.J. Correia, F. Sousa, Improved minicircle DNA biosynthesis for gene therapy applications, *Hum. Gene Ther. Methods.* 25 (2014) 93–105. doi:10.1089/hgtb.2013.020.
- [38] V. Gaspar, D. De Melo-Diogo, E. Costa, A. Moreira, J. Queiroz, C. Pichon, I. Correia, F. Sousa, Minicircle DNA vectors for gene therapy: Advances and applications, *Expert Opin. Biol. Ther.* 15 (2015) 353–379. doi:10.1517/14712598.2015.996544.
- [39] T. Diamantino, P. Pereira, J.A. Queiroz, Â. Sousa, F. Sousa, Minicircle DNA purification using a CIM® DEAE-1 monolithic support, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 3544–3549. doi:10.1002/jssc.201600375.
- [40] N.R. Cozzarelli, R.B. Kelly, A. Kornberg, A minute circular DNA from *Escherichia coli* 15., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 60 (1968) 992–999. doi:10.1073/pnas.60.3.992.
- [41] M.A. Kay, C.Y. He, Z.Y. Chen, A robust system for production of minicircle DNA vectors, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 1287–1289. doi:10.1038/nbt.1708.
- [42] A.M. Almeida, J.A. Queiroz, F. Sousa, Â. Sousa, Minicircle DNA: The Future for DNA-Based Vectors?, *Trends Biotechnol.* 38 (2020) 1047–1051. doi:10.1016/j.tibtech.2020.04.008.
- [43] L.S. Vygotsky, Chapter 11 Chapter 11, *Orthod. Treat. Cl. III Malocclusion.* 1990 (1999) 306.
- [44] C.P.A. Alves, D.M.F. Prazeres, G.A. Monteiro, Minicircle Biopharmaceuticals—An Overview of Purification Strategies, *Front. Chem. Eng.* 2 (2021) 1–15. doi:10.3389/fceng.2020.612594.
- [45] N. Nafissi, M. Foldvari, Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic

- nanotechnology tools, *Front. Neurosci.* 9 (2015) 1–16. doi:10.3389/fnins.2015.00355.
- [46] Z.Y. Chen, C.Y. He, M.A. Kay, Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo, *Hum. Gene Ther.* 16 (2005) 126–131. doi:10.1089/hum.2005.16.126.
- [47] S. Carson, H.B. Miller, D.S. Witherow, M.C. Srougi, Part I. Manipulation of DNA, 2019. doi:10.1016/b978-0-12-815774-9.00046-0.
- [48] A. Xenopoulos, P. Pattnaik, Production and purification of plasmid DNA vaccines: Is there scope for further innovation?, *Expert Rev. Vaccines.* 13 (2014) 1537–1551. doi:10.1586/14760584.2014.968556.
- [49] D. Gomes, D. Costa, J.A. Queiroz, L.A. Passarinha, A. Sousa, A new insight in gellan microspheres application to capture a plasmid DNA vaccine from an *Escherichia coli* lysate, *Sep. Purif. Technol.* 274 (2021) 119013. doi:10.1016/j.seppur.2021.119013.
- [50] P. Guerrero-Germán, R.M. Montesinos-Cisneros, D.M.F. Prazeres, A. Tejada-Mansir, Purification of plasmid DNA from *Escherichia coli* ferments using anion-exchange membrane and hydrophobic chromatography, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 58 (2011) 68–74. doi:10.1002/bab.12.
- [51] A. Eon-Duval, K. Gumbs, C. Ellett, Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: Use of experimental design to determine reaction conditions, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 544–553. doi:10.1002/bit.10704.
- [52] D. Walls, J.M. Walker, *Protein Chromatography IN Series Editor*, 2017.
- [53] M. Zhao, M. Vandersluis, J. Stout, U. Haupts, M. Sanders, R. Jacquemart, Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time?, *Vaccine.* 37 (2019) 5491–5503. doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.090.
- [54] GE Healthcare, *Affinity Chromatography: Principles and Methods*, GE Heal. Handbooks. (2007) 159. doi:18-1132-29.
- [55] E.L. Rodriguez, S. Poddar, S. Iftexhar, K. Suh, A.G. Woolfork, S. Ovbude, A. Pekarek, M. Walters, S. Lott, D.S. Hage, Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1157 (2020) 122332. doi:10.1016/j.jchromb.2020.122332.
- [56] A.M. Almeida, J.A. Queiroz, F. Sousa, A. Sousa, Minicircle DNA purification:

- Performance of chromatographic monoliths bearing lysine and cadaverine ligands, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1118–1119 (2019) 7–16. doi:10.1016/j.jchromb.2019.04.024.
- [57] I.M. Handbook, B.S. Surface, ÄKTA™ Laboratory-scale Chromatography Systems Biacore Sensor Surface Handbook GST Gene Fusion System Handbook, Cell Sep. Media Methodol. Appl. (n.d.) 18–1115. www.gelifesciences.com/handbooks.
- [58] P. J Shetty, The Evolution of DNA Extraction Methods, *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 8 (2020) 39–45. doi:10.34297/ajbsr.2020.08.001234.
- [59] A.M. Almeida, D. Eusébio, J.A. Queiroz, F. Sousa, A. Sousa, The use of size-exclusion chromatography in the isolation of supercoiled minicircle DNA from *Escherichia coli* lysate, *J. Chromatogr. A.* 1609 (2020). doi:10.1016/j.chroma.2019.460444.
- [60] M.R. Aires-Barros, A.M. Azevedo, *Fundamentals of Biological Separation Processes*, Elsevier B.V., 2017. doi:10.1016/B978-0-444-63668-3.00007-X.
- [61] K.O. Eriksson, *Hydrophobic Interaction Chromatography*, Elsevier Ltd., 2018. doi:10.1016/B978-0-08-100623-8.00019-0.
- [62] F. Sousa, L. Passarinha, J.A. Queiroz, Biomedical application of plasmid DNA in gene therapy : A new challenge for chromatography *Biomedical application of plasmid DNA in gene therapy : A new challenge for chromatography*, 8725 (2013). doi:10.5661/bger-26-83.
- [63] C.P.A. Alves, M. Šimčíková, L. Brito, G.A. Monteiro, D.M.F. Prazeres, Production and Purification of Supercoiled Minicircles by a Combination of in Vitro Endonuclease Nicking and Hydrophobic Interaction Chromatography, *Hum. Gene Ther. Methods.* 29 (2018) 157–168. doi:10.1089/hgtb.2018.046.
- [64] E. Ec, I. Obbina, W. VA, Applications of Column, Paper, Thin Layer and Ion Exchange Chromatography in Purifying Samples: Mini Review, *SF J. Pharm. Anal. Chem.* 2 (2019) 3–5. <https://scienceforecastoa.com/>.
- [65] C.A. Buckner, R.M. Lafrenie, J.A. Dénommée, J.M. Caswell, D.A. Want, G.G. Gan, Y.C. Leong, P.C. Bee, E. Chin, A.K.H. Teh, S. Picco, L. Villegas, F. Tonelli, M. Merlo, J. Rigau, D. Diaz, M. Masuelli, S. Korrapati, P. Kurra, S. Puttugunta, S. Picco, L. Villegas, F. Tonelli, M. Merlo, J. Rigau, D. Diaz, M. Masuelli, M. Tascilar, F.A. de Jong, J. Verweij, R.H.J. Mathijssen, The Role of Ion Exchange Chromatography in Purification and Characterization of Molecules, *Intech.* 11 (2016) 13. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.

- [66] X. Yang, A. Merenda, R. AL-Attabi, L.F. Dumée, X. Zhang, S.H. Thang, H. Pham, L. Kong, Towards next generation high throughput ion exchange membranes for downstream bioprocessing: A review, *J. Memb. Sci.* 647 (2022). doi:10.1016/j.memsci.2022.120325.
- [67] W. Shi, F. Zhang, G. Zhang, Mathematical analysis of affinity membrane chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1081 (2005) 156–162. doi:10.1016/j.chroma.2005.05.031.
- [68] C. Boi, *Membrane chromatography for biomolecule purification*, Elsevier Inc., 2019. doi:10.1016/B978-0-12-813606-5.00006-3.
- [69] V. Orr, L. Zhong, M. Moo-Young, C.P. Chou, Recent advances in bioprocessing application of membrane chromatography, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 450–465. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.007.
- [70] J.F.A. Valente, J.A. Queiroz, F. Sousa, Dilemma on plasmid DNA purification: binding capacity vs selectivity, *J. Chromatogr. A.* 1637 (2021) 461848. doi:10.1016/j.chroma.2020.461848.
- [71] L.R. Pereira, D.M.F. Prazeres, M. Mateus, Hydrophobic interaction membrane chromatography for plasmid DNA purification: Design and optimization, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1175–1184. doi:10.1002/jssc.200900844.
- [72] A. Nath, M.M. Zin, M.A. Molnár, S. Bánvölgyi, I. Gáspár, G. Vatai, A. Koris, Membrane Chromatography and Fractionation of Proteins from Whey—A Review, *Processes.* 10 (2022). doi:10.3390/pr10051025.
- [73] J. Weaver, S.M. Husson, L. Murphy, S.R. Wickramasinghe, Anion exchange membrane adsorbers for flow-through polishing steps: Part II. Virus, host cell protein, DNA clearance, and antibody recovery, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (2013) 500–510. doi:10.1002/bit.24724.
- [74] S.C. Tan, B.C. Yiap, DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present, *J. Biomed. Biotechnol.* 2009 (2009). doi:10.1155/2009/574398.
- [75] L. Zhong, K. Srirangan, J. Scharer, M. Moo-Young, D. Fenner, L. Crossley, C. Howie Honeyman, S.Y. Suen, C. Perry Chou, Developing an RNase-free bioprocess to produce pharmaceutical-grade plasmid DNA using selective precipitation and membrane chromatography, *Sep. Purif. Technol.* 83 (2011) 121–129. doi:10.1016/j.seppur.2011.09.024.
- [76] M.A. Fernández, N. Bellotti, Silica-based bioactive solids obtained from modified diatomaceous earth to be used as antimicrobial filler material, *Mater. Lett.* 194 (2017) 130–134. doi:10.1016/j.matlet.2017.01.144.

- [77] M. Hasan, T. Saidi, M. Afifuddin, Mechanical properties and absorption of lightweight concrete using lightweight aggregate from diatomaceous earth, *Constr. Build. Mater.* 277 (2021) 122324. doi:10.1016/j.conbuildmat.2021.122324.
- [78] A.A. Reka, B. Pavlovski, E. Fazlija, A. Berisha, M. Pacarizi, M. Daghmehchi, C. Sacalis, G. Jovanovski, P. Makreski, A. Oral, Diatomaceous Earth: Characterization, thermal modification, and application, *Open Chem.* 19 (2021) 451–461. doi:10.1515/chem-2020-0049.
- [79] J.J. Labisch, F. Bollmann, M.W. Wolff, K. Pflanz, A new simplified clarification approach for lentiviral vectors using diatomaceous earth improves throughput and safe handling, *J. Biotechnol.* 326 (2021) 11–20. doi:10.1016/j.jbiotec.2020.12.004.
- [80] J. Stephenson, C. Bladen, I. Wilkinson, Application Note Rapid Mammalian Cell Harvest without Centrifugation for Antibody Purification Using the Sartoclear Dynamics® Lab Filtration System, (2018). www.absoluteantibody.com.
- [81] A. Sousa, A.M. Almeida, U. Černigoj, F. Sousa, J.A. Queiroz, Histamine monolith versatility to purify supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid from *Escherichia coli* lysate, *J. Chromatogr. A.* 1355 (2014) 125–133. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.003.
- [82] S.S. Freitas, J.A.L. Santos, D.M.F. Prazeres, Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 1179–1186. doi:10.1021/bp060052d.
- [83] F. Smrekar, A. Podgornik, M. Ciringer, S. Kontrec, P. Raspor, A. Štrancar, M. Peterka, Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns, *Vaccine.* 28 (2010) 2039–2045. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.061.
- [84] K. Benčina, M. Benčina, A. Podgornik, A. Štrancar, Influence of the methacrylate monolith structure on genomic DNA mechanical degradation, enzymes activity and clogging, *J. Chromatogr. A.* 1160 (2007) 176–183. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.034.
- [85] For Convenient Mammalian Cell Culture Harvesting 70 % Faster Clarification and Sterile Filtration of up to 1 , 000 mL Mammalian Cell Cultures, (n.d.).
- [86] J.X. Zhou, T. Tressel, U. Gottschalk, F. Solamo, A. Pastor, S. Dermawan, T. Hong, O. Reif, J. Mora, F. Hutchison, M. Murphy, New Q membrane scale-down model for process-scale antibody purification, *J. Chromatogr. A.* 1134 (2006) 66–73.

doi:10.1016/j.chroma.2006.08.064.

- [87] F. Sousa, D.M.F. Prazeres, J.A. Queiroz, Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 518–525. doi:10.1016/j.tibtech.2008.05.005.
- [88] D.M.F. Prazeres, G.N.M. Ferreira, Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 43 (2004) 609–624. doi:10.1016/j.cep.2003.02.002.
- [89] A. Note, Plasmid DNA purification, *Curr. Opin. Microbiol.* 1 (1998) i. doi:10.1016/s1369-5274(98)80046-5.

