



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Desenvolvimento de novas metodologias de purificação de DNA minicircular usando suportes monolíticos

Tatiana Santos Roque Diamantino

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

Orientadora: Prof^a. Doutora Fani Sousa
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Ângela Sousa

Covilhã, junho de 2015

Para as pessoas mais
importantes da minha vida e que eu amo muito,
Os meus pais.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à Professora Doutora Fani Sousa e à Professora Doutora Ângela Sousa por possibilitarem-me desenvolver este trabalho e por acreditarem nas minhas capacidades para o fazer. Estou grata por toda a ajuda e conhecimento que me transmitiram, o que permitiu progredir no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à Universidade da Beira Interior, particularmente ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde por fornecer as condições necessárias ao desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos os investigadores do Centro de Investigação em Ciências da Saúde, especialmente aos meus colegas de laboratório, por toda a ajuda disponibilizada.

Agradeço à Lúcia Amorim pela ajuda, pela orientação e pelo conhecimento que partilhou comigo, à Ana Margarida Almeida e à Patrícia Pereira por terem ajudado no desenvolvimento de técnicas de PCR e por estarem sempre disponíveis, quando eu precisava.

Agradeço aos meus amigos por todo o apoio e por todas as conversas e bons momentos, especialmente à Vanessa Figueiredo, Joana Raimundo, Fabiana Santos e Sónia Alves.

Agradeço à minha família por toda a paciência e amor, particularmente aos meus pais que sempre acreditaram nas minhas capacidades sacrificando-se para possibilitarem-me a minha continuação nos estudos. Agradeço do fundo meu coração por toda a compreensão, apoio e bons conselhos. São as pessoas mais importantes da minha vida, e de quem eu tenho um enorme orgulho. Amo-vos muito.

Finalmente, agradeço ao João por ter estado sempre a meu lado, por apoiar-me nas alturas mais difíceis, demonstrando sempre o que é o amor e uma verdadeira amizade. Obrigado por fazeres-me sorrir e por nunca deixares-me desistir.

Resumo

Atualmente existem diversas patologias que não têm cura através das terapias convencionais, causando a morte a milhares de pessoas. Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de terapias alternativas para a sua prevenção e tratamento.

A terapia génica e as vacinas de DNA são consideradas terapêuticas promissoras no tratamento de doenças hereditárias e adquiridas. Baseiam-se na transferência de genes e requerem o uso de vetores que sejam seguros e eficientes. Os vetores virais apesar de serem mais eficientes na transferência de genes comprometem a segurança, e como tal tem havido uma crescente aposta na utilização de vetores não-virais como o DNA plasmídico (pDNA). Porém, apesar deste vetor ser mais seguro, de simples produção e de baixo custo, exhibe algumas limitações associadas à presença da região de amplificação bacteriana, podendo desencadear respostas inflamatórias e imunitárias ou promover efeitos genotóxicos.

Com a finalidade de ultrapassar os obstáculos inerentes ao pDNA, surgiu um novo produto biotecnológico com perspectivas terapêuticas benéficas designado por DNA minicircular (mcDNA). Esta biomolécula resulta de uma recombinação intramolecular do plasmídeo parental (PP) numa cultura bacteriana, sendo constituída exclusivamente pela unidade de transcrição eucariótica. Assim, o mcDNA é considerado um vetor mais seguro, que promove um aumento do efeito terapêutico. Contudo, por ser ainda uma abordagem recente, exige a realização de mais estudos com o objetivo de otimizar-se o processo de recombinação e desenvolver-se um método de purificação adequado, que obedeça às normas impostas pelas autoridades reguladoras, e que consequentemente permita a aplicação terapêutica deste vetor da “nova geração”.

O trabalho apresentado nesta tese teve por base o objetivo de obter-se melhores rendimentos de produção de mcDNA, testando diversas percentagens de L-arabinose, e de otimizar a sua recuperação. Posteriormente, foi estudada a etapa de purificação desta biomolécula usando um suporte monolítico de troca aniónica, caracterizado por apresentar uma elevada capacidade de ligação e excelentes propriedades de transferência de massa. Os resultados revelaram que esta coluna apresenta boa resolução e seletividade para separar as impurezas da isoforma superenrolada do mcDNA. Numa primeira fase foi realizada a separação entre o DNA e o RNA, e posteriormente entre o mcDNA e o PP. Averiguou-se que o mcDNA superenrolado tem tendência a eluir primeiramente, o que poder-se-á justificar pelo seu tamanho mais reduzido, apresentando uma densidade de carga inferior. A fim de confirmar-se a pureza da amostra obtida efetuaram-se ensaios de quantificação de diversos contaminantes que revelaram a ausência de RNA e de proteínas, e que a quantidade de DNA genómico e de endotoxinas obedecia aos valores referenciados pelas agências reguladoras, como a “Food and Drug Administration” (FDA).

Em suma, a utilização deste suporte monolítico pode ser uma solução promissora para a obtenção da amostra de mcDNA com a qualidade adequada para futuras aplicações terapêuticas.

Palavras-chave

Cromatografia de troca aniônica; DNA minicircular; Plasmídeo parental; Tecnologia de DNA recombinante.

Abstract

Nowadays there are several diseases that fail to cure with conventional therapies, killing thousands of people. Therefore, it is essential to develop alternative therapies for prevention and treatment of these diseases.

Gene therapy and DNA vaccines are considered promising therapeutics in the treatment of inherited and acquired diseases. They are based on gene transfer and require the use of safe and effective vectors. Viral vectors allow the efficient gene transfer, but compromise the security. For this reason, it was warged increasingly the use of non-viral vectors such as plasmid DNA (pDNA). This vector is safe, simple and with low cost production, but has some limitations associated with the presence of bacterial amplification region, potentially triggering inflammatory and immune responses or promoting genotoxic effects.

To overcome the pDNA limitations, it appeared a new biotechnology product with beneficial therapeutic perspectives named DNA minicircular (mcDNA). This biomolecule results from the intramolecular recombination of the parent plasmid (PP) in a bacterial culture, being constituted only by eukaryotic transcription unit. Thus, the mcDNA is considered a safer vector, which promotes an increase in the therapeutic effect. However, given that it is a new approach requires further studies with the aim of optimizing the recombination process and to develop a method of suitable purification, complying with the standards imposed by regulatory agencies, and consequently allow the therapeutic application of this vector of "new generation".

The aim of the work presented in this thesis was to get better mcDNA production yields, testing various percentages of L-arabinose, and optimize their recovery. Subsequently, was studied the biomolecule purification step using an anion exchange monolithic support, characterized for the high binding capacity and excellent mass transfer properties. The results revealed that this column shows good resolution and selectivity to firstly eliminate the RNA impurity and then to separate the supercoiled mcDNA isoform from other ineffective topologies, such as open circular mcDNA or PP isoforms. It was established that the mcDNA tends to elute first, which can be justified by its smaller size, with a lower charge density. In order to confirm the purity of the obtained sample, quantification assays of various contaminants were performed, which revealed the absence of RNA and proteins, and the amount of genomic DNA and endotoxins obeyed the values referenced by the regulatory agencies such as "Food and Drug Administration" (FDA).

In conclusion, the use of a monolithic support may be a promising approach for obtaining the mcDNA sample of adequate quality for future therapeutic applications.

Keywords

Anion exchange chromatography; Minicircle DNA; Parental plasmid; Recombinant DNA technology.

Índice

CAPÍTULO 1- Introdução	1
1.1 Estratégias terapêuticas à base de DNA	1
1.1.1 Terapia génica	1
1.1.2 Vacinas de DNA	3
1.1.3 Vetores virais e vetores não virais	6
1.1.3.1 Vetores virais	7
1.1.3.2 Vetores não virais	8
1.1.3.2.1 Métodos físicos	9
1.1.3.2.2 Métodos químicos.....	10
1.2 Tecnologia de DNA plasmídico	11
1.2.1 Processo “Upstream”	12
1.2.2 Processo “Downstream”	14
1.2.3 Purificação de pDNA	15
1.2.3.1 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)	16
1.2.3.2 Cromatografia de troca aniónica (AEC)	17
1.2.3.3 Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC).....	17
1.2.3.4 Cromatografia de afinidade (AC).....	18
1.2.4 Tecnologia monolítica	18
1.2.5 Inconvenientes do pDNA, na abordagem terapêutica.....	19
1.3 DNA minicircular	20
1.3.1 Síntese do mcDNA	20
1.3.2 Vantagens e limitações do mcDNA na terapia génica	22
1.3.3 Experiências de purificação do mcDNA	23
CAPÍTULO 2 - Materiais e Métodos	25
2.1 Materiais	25

2.2. Métodos.....	25
2.2.1 Condições de crescimento bacteriano e amplificação do PP	25
2.2.2 Síntese de mcDNA	25
2.2.3 Recuperação do mcDNA	26
2.2.3.1 Lise alcalina utilizando o kit da Qiagen.....	26
2.2.3.2 Lise alcalina para a obtenção de uma amostra complexa	26
2.2.3.3 Linearização da amostra de mcDNA	27
2.2.4 Purificação do mcDNA	27
2.2.4.1 Cromatografia de troca aniónica.....	27
2.2.4.2 Eletroforese em gel de agarose	28
2.2.4.3 Quantificação de proteínas	28
2.2.4.4 Quantificação de DNA genómico	29
2.2.4.5 Quantificação de endotoxinas	30
CAPÍTULO 3- Resultados e Discussão	33
3.1 Biosíntese do mcDNA.....	33
3.2 Recuperação do mcDNA	39
3.2.1 Lise alcalina e pré-purificação utilizando o kit da Qiagen	39
3.2.2 Lise alcalina para a obtenção de uma amostra complexa	42
3.2.3 Produção e Recuperação do PP	44
3.2.4 Linearização das amostras de mcDNA	45
3.3 Purificação do mcDNA	46
3.3.1 Coluna de troca aniónica.....	46
3.4 Avaliação da pureza do mcDNA	56
CAPÍTULO 4- Conclusões e perspectivas futuras	59
Referências	61

Lista de Figuras

Capítulo 1 - Introdução

- Figura 1. Métodos *in vivo* e *ex vivo*, aplicados em terapia génica. A terapêutica *in vivo* baseia-se na administração direta do gene de interesse, no organismo do paciente. No método *ex vivo* ocorre primeiramente o isolamento das células do paciente, que são geneticamente modificadas e só depois reintroduzidas no organismo (adaptado de [15]).2
- Figura 2. Representação esquemática das vias de apresentação de antigénio (adaptado de [32,33]).4
- Figura 3. Esquematização dos ensaios clínicos a decorrer atualmente na área das vacinas de DNA (adaptado de [34]).6
- Figura 4. Vetores utilizados nos ensaios de terapia génica (adaptado de [25]).9
- Figura 5. Representação da estrutura geral do DNA plasmídico (adaptado de [41]). 13
- Figura 6. As etapas fundamentais dos processos “Upstream” e “Downstream” para a obtenção do pDNA puro (adaptado de [21,48]). 15
- Figura 7. Esquema da produção do mcDNA, a partir do PP. A L-arabinose induz a ação da recombinase phiC31 que reconhece as sequências attB e attP, permitindo a formação do mcDNA e do mP. Simultaneamente, a endonuclease *Scel-I* é ativada e degrada o mP e resíduos de PP (adaptado de [76]). 21

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

- Figura 8. Curva de referência para os padrões de BSA, utilizada para quantificar-se o teor de proteínas presente nas amostras purificadas. 29
- Figura 9. Curva de referência para os padrões de gDNA, utilizada para quantificar-se o teor de DNA genómico presente nas amostras purificadas. 30
- Figura 10. Curva de referência para os padrões de endotoxinas, utilizada para quantificar-se o teor de endotoxinas presente nas amostras purificadas. 31

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

Figura 11. Curva de crescimento da *E.coli* transformada com o plasmídeo parental. 34

Figura 12. Esquematização das duas estratégias de indução utilizadas na produção de mcDNA. A) Indução por adição de 0,1% de L-arabinose a 250 mL de meio TB, após amplificação bacteriana do PP. B) Indução por adição de 0,1% de L-arabinose e uma mistura indutora, constituída por meio LB (25 g/L) e por NaOH (1,0 M). 36

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose das amostras de mcDNA. A) M: Marcador; Linha 1: Amostra de mcDNA produzido através da estratégia sem mistura indutora. B) Amostra de mcDNA produzido através da estratégia com mistura indutora. 37

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose das amostras de mcDNA produzido através de indução com: A) 0,01% de L-arabinose; B) 0,1% de L-arabinose; C) 0,2% de L-arabinose. 38

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose das amostras de mcDNA, após isolamento com o kit da Qiagen com ligeiras modificações. A) Linha 1: Fração recolhida durante a passagem do tampão de eluição a 1,75 M de NaCl; Linha 2: Fração recolhida durante a passagem do tampão de eluição a 1,25 M de NaCl. B) M: Marcador; Linha 1: Amostra de mcDNA recuperado na estratégia com 0,75 M e 1,75 M de NaCl, no tampão de lavagem e no tampão de eluição, respetivamente. 40

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose das amostras de mcDNA, após isolamento com o kit da Qiagen com ligeiras modificações. Em todas as experiências utilizou-se 1,75 M de NaCl no tampão de eluição. A) A: Amostra de mcDNA quando utilizado 1,00 M de NaCl no tampão de lavagem; Linha 1 e Linha 2: Fração durante a primeira lavagem; Linha 3: Fração durante a segunda lavagem; Linha 4: Fração durante a eluição. B) A: Amostra de mcDNA quando utilizado 0,80 M de NaCl no tampão de lavagem; Linha 1: Fração durante a primeira lavagem; Linha 2: Fração durante a segunda lavagem; Linha 3: Fração durante a eluição. 41

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose das amostras de lisados clarificados. A) Linha 1: Amostra de lisado obtida após precipitação com 1,5 M de sulfato de amónio; Linha 2: Amostra de lisado obtida após precipitação com 2,0 M de sulfato de amónio; Linha 3: Amostra de lisado obtida após precipitação com 2,5 M de sulfato de amónio; Linha 4: Ressuspensão do pellet com Tris-HCl, após precipitação com 1,5 M de sulfato de amónio; Linha 5: Ressuspensão do pellet com Tris-HCl, após precipitação com 2,0 M de sulfato de amónio; Linha 6: Ressuspensão do pellet com Tris-HCl, após precipitação com 2,5 M de sulfato de amónio. B) Eletroforese em gel de agarose das amostras de lisado clarificado após otimização da concentração de sulfato de amónio para 2,0 M, no passo de precipitação. M: Marcador; Linha 1: Amostra de lisado clarificado de mcDNA. 43

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose das amostras de PP recuperado com o kit da Qiagen. A) Amostra de PP que foi obtida quando utilizou-se 0,50 M e 1,25 de NaCl, no tampão de lavagem e no tampão de eluição, respetivamente (procedimento ajustado pelo grupo de investigação). B) Amostra de PP que foi obtida após a otimização do processo usando 0,80 M e 1,75 M de NaCl, no tampão de lavagem e no tampão de eluição, respetivamente.	44
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose da amostra de mcDNA. Linha 1: Amostra de mcDNA recuperada com o kit da Qiagen. Linha 2: Amostra de mcDNA após ser linearizada, com a enzima BamHI.	45
Figura 20. A) Cromatograma que representa a aplicação de uma amostra de lisado, numa coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente por passos a 500 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. Linha 1, 2 e 3: Frações correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma, respetivamente.....	47
Figura 21. Cromatogramas representativos da injeção de 500 µL de lisado no suporte monolítico de troca aniónica, usando diferentes gradientes de eluição. A) Gradiente por passos a 600 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM Tris-HCl, pH 8,0. B) Gradiente por passos a 630 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM Tris-HCl, pH 8,0. C) Gradiente por passos a 650 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM Tris-HCl, pH 8,0. D) Gradiente por passos a 750 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM Tris-HCl, pH 8,0.....	48
Figura 22. A) Cromatograma que representa a aplicação de uma amostra de lisado, numa coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente por passos a 600 mM e 1,0 M de NaCl, em 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. Linha 1 e 2: Frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.....	49
Figura 23. A) Cromatograma que representa a aplicação de uma amostra de lisado, numa coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente por passos a 650 mM e 1,0 M de NaCl, em 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1 e 2: Frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.....	50
Figura 24. A) Cromatograma que representa a aplicação de uma amostra de lisado, numa coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente por passos a 680 mM e 1,0 M de NaCl, em 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1 e 2: Frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.....	51

Figura 25. A) Cromatograma resultante da aplicação de uma amostra de lisado, na coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente linear de 680 mM a 740 mM de NaCl, em 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. No final foi realizado um passo a 1,0 M NaCl. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1, 2, 3 e 4: Frações correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma, respetivamente. 52

Figura 26. A) Cromatograma resultante da aplicação de um amostra de lisado, na coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente linear de 680 mM a 740 mM de NaCl, em 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0. No final do gradiente foi realizado um passo a 1,0 M de NaCl. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1, 2 e 5: Frações correspondentes aos picos 1, 2 e 5 do cromatograma, respetivamente. C) Cromatograma resultante da aplicação de um amostra de lisado, na coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente linear de 680 mM a 740 mM de NaCl, em 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. No final do gradiente foi realizado um passo a 1,0 M de NaCl. D) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. Linha 1, 2, 3, 4 e 5: Frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente. 53

Figura 27. A) Cromatograma resultante da aplicação de lisado, na coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente linear de 700 mM a 750 mM de NaCl, em 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. No final foi realizado um passo a 1,0 M de NaCl. B) Análise de cada pico observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. Linha 1, 2, 3, 4 e 5: Frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente. 54

Figura 28. A) Cromatograma resultante da aplicação de lisado, na coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente linear de 710 mM a 750 mM de NaCl, em 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. No final foi realizado um passo a 1,0 M de NaCl. B) Análise de cada pico observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1, 2, 3, 4 e 5: Frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente. 55

Figura 29. Análise da amplificação do gDNA, através da eletroforese em gel de agarose. M: Marcador; Linha 1: Controlo negativo; Linha 2: Amostra de gDNA amplificada. 57

Lista de Tabelas

Capítulo 1 - Introdução

Tabela 1. Vantagens e desvantagens das vacinas de DNA (adaptado de [1,32]).	5
Tabela 2. Especificações que determinam a pureza e segurança do pDNA para aplicação terapêutica (adaptado de [22,39]).	16
Tabela 3. Vantagens e desvantagens do mcDNA (adaptado de [9,26]).	23

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

Tabela 4. Rendimento de produção do mcDNA correspondente às duas estratégias de indução, utilizando 0,1% de L-arabinose.	37
Tabela 5. Avaliação da produção de mcDNA, usando diferentes percentagens de indutor e utilizando a mistura indutora, como estratégia de indução.	38
Tabela 6. Demonstração do rendimento do mcDNA quando usado o meio TB ou meio LB na mistura indutora.	39
Tabela 7. Resultados da recuperação do mcDNA quando usadas diferentes concentrações de NaCl no tampão de lavagem, durante a aplicação do kit da Qiagen.	42
Tabela 8. Resultados do rendimento do lisado quando usadas diferentes concentrações de sulfato de amónio no passo da precipitação, durante a lise alcalina modificada.	43
Tabela 9. Resultados do rendimento de recuperação do PP quando usadas diferentes concentrações de sal, nos tampões de lavagem e de eluição, durante a purificação com o kit da Qiagen.....	44
Tabela 10. Resumo do efeito da concentração de sal na eluição e/ou retenção das diferentes biomoléculas, presentes numa amostra de lisado.	48
Tabela 11. Resultados das quantificações de gDNA, proteínas e endotoxinas, na amostra de sc de mcDNA purificada.	58

Lista de Acrónimos

µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Celsius
AC	Cromatografia de afinidade
AEC	Cromatografia de troca aniónica
APCs	Células apresentadoras de antígenos
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos
EU	Unidades de Endotoxinas
FDA	“Food and Drug Administration”
g	Gramma
gDNA	DNA genómico
HCl	Ácido Clorídrico
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
K ₂ HPO ₄	Fosfato Dipotássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássio
kpb	Quilo pares de bases

L	Litro
LB	“Luria-Bertani”
M	Molar
mA	Miliamperes
mcDNA	DNA minicircular
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
min	Minuto
miRNA	MicroRNA
mL	Militro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanómetro
oc	Circular aberta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDNA	DNA plasmídico
PP	Plasmídeo Parental
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
sc	Superenrolada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEC	Cromatografia de exclusão molecular
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
siRNA	Pequeno RNA de interferência

TAE	Tris, ácido acético EDTA
TB	“Terrific Broth”
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
V	Voltes
w/v	massa/volume

CAPÍTULO 1- Introdução

1.1 Estratégias terapêuticas à base de DNA

Atualmente estão identificadas diversas patologias para as quais não são conhecidas terapêuticas eficazes [1]. Assim sendo, nas últimas décadas tem havido um crescente interesse na prevenção e tratamento de patologias graves, que permitam aumentar a esperança de vida dos doentes [2,3]. Isto é evidenciado pelos desenvolvimentos inovadores na área da saúde e que revelam uma interação entre a medicina, biologia e engenharia [4].

A Biotecnologia moderna é uma área da ciência que está em rápida evolução, e que tem usado a informação genética, para desenvolver metodologias que possibilitem o tratamento de doenças, que nos dias de hoje são incuráveis [4,5]. Esta abordagem aproximou-se mais da realidade depois da descodificação do genoma humano, que facultou o conhecimento sobre a existência de doenças dependentes de genes [6,7].

Como tal, desenvolveram-se estratégias terapêuticas baseadas na transferência de genes, nomeadamente a terapia génica [8] e as vacinas de DNA [9]. Ambas as terapias têm demonstrado potencial na evolução da medicina clínica [7,10], sendo consideradas terapêuticas alternativas promissoras [5,11,12], que têm como principal objetivo o tratamento de doenças hereditárias e adquiridas [13,14].

1.1.1 Terapia génica

A terapia génica iniciou os seus ensaios clínicos há mais de duas décadas e, apesar dos efeitos adversos observados inicialmente [15], hoje em dia é considerada uma terapêutica promissora, principalmente, no tratamento de doenças genéticas, mas também de doenças neurológicas e infecciosas [4,16-18]. Esta terapia baseia-se na transferência de ácidos nucleicos que codificam o gene funcional, na célula-alvo, com a finalidade de substituir ou reparar o gene mutado [19,20], regulando assim os processos celulares [21,22]. Como tal, a terapia génica só é possível devido à capacidade das células captarem a informação genética nova e expressarem as proteínas codificadas [2,7]. Contudo, para a realização desta terapêutica é crucial a identificação correta do gene adequado ao tratamento da doença [23] e de um sistema de transporte eficiente, preciso e seguro [3,24-27]. Dois dos grandes problemas associados à entrega génica são os eventos de integração no genoma da célula que podem resultar na oncogénese ou no silenciamento de genes [27], e os efeitos adversos que podem ser causados às células saudáveis, devido à falta de uma entrega génica direcionada

ao alvo [23, 24]. Para tal, a investigação tem evoluído na tentativa de promover o direcionamento específico, construindo assim um vetor adequado a cada terapêutica [23,28]. Existem dois métodos que podem ser aplicados nesta estratégia terapêutica, que estão retratados na figura 1. O método *ex vivo* baseia-se na introdução do gene nas células isoladas do paciente, que posteriormente serão reintroduzidas no hospedeiro, a fim de ocorrer a expressão da proteína desejada. Considerando que procede-se ao isolamento celular, estas células poderão ser modificadas *in vitro*, antes da reinfusão, melhorando a segurança e a eficácia [4, 15]. Por outro lado, existe também o método *in vivo* no qual ocorre injeção direta do material genético no paciente, por exemplo no músculo [4,16]. É de realçar que atualmente a terapia génica não se baseia exclusivamente na entrega de DNA, pois têm-se utilizado outros ácidos nucleicos, nomeadamente o microRNA (miRNA) e o pequeno RNA de interferência (siRNA) [10,16,25].

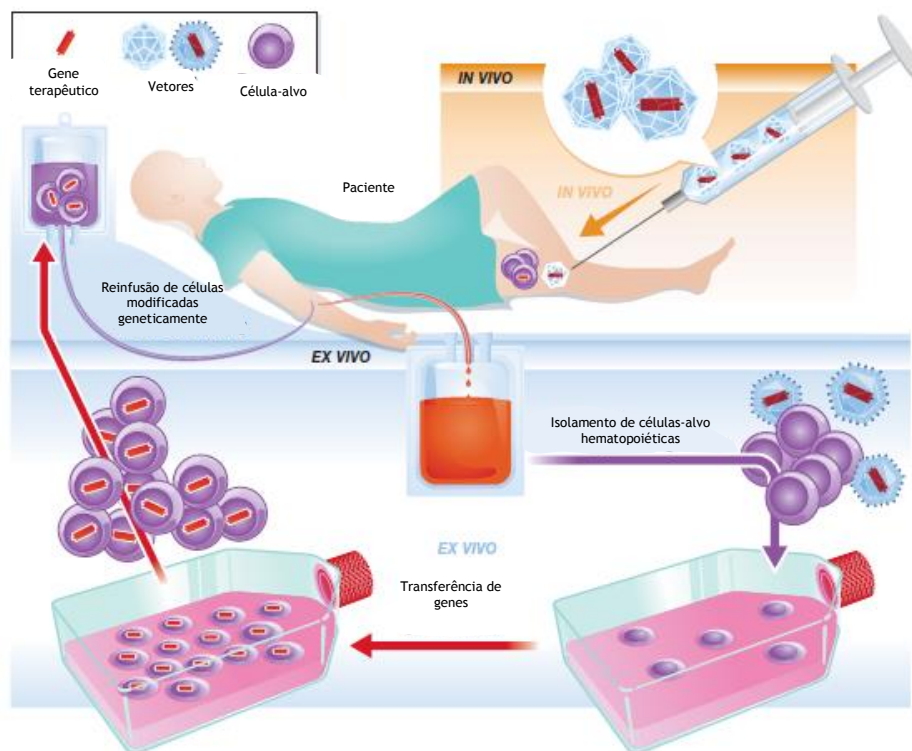


Figura 1. Métodos *in vivo* e *ex vivo*, aplicados em terapia génica. A terapêutica *in vivo* baseia-se na administração direta do gene de interesse, no organismo do paciente. No método *ex vivo* ocorre primeiramente o isolamento das células do paciente, que são geneticamente modificadas e só depois reintroduzidas no organismo (adaptado de [15]).

Hoje em dia, os riscos associados à terapia génica estão a ser alvo de pesquisa, sendo que os sucessos terapêuticos têm incentivado o seu desenvolvimento. Assim, tem havido um crescente avanço nesta tecnologia de transferência de genes, e se inicialmente se focava apenas em doenças monogénicas, atualmente apresenta uma aplicabilidade mais generalizada, com mais de 1900 ensaios clínicos em curso [15,25]. Portanto, considera-se que

a terapia génica resulta de um equilíbrio entre a segurança e a eficácia [27], e que quando aperfeiçoados estes pontos conseguirá ter o potencial clínico completo [26], podendo ser no futuro a terapêutica aplicada para o tratamento de diversas doenças [15,17,29].

1.1.2 Vacinas de DNA

A vacinação é considerada uma das maiores conquistas da medicina moderna, pois permite controlar a propagação de doenças infecciosas [1,30]. Edward Jenner iniciou um dos métodos mais relevantes na medicina - a prevenção. Desde então o estudo sobre a vacina tem-se equilibrado entre o progresso e a estagnação [31]. Nas últimas décadas têm-se observado desenvolvimentos significativos [31], porém a eficácia das vacinas tem de ser controlada ao longo do tempo e a sua segurança ainda representa uma limitação [1,32].

A vacina tem como principal objetivo a prevenção de doenças, a fim de desencadear-se uma resposta imune contra um agente patogénico [1,4,33]. Atualmente são comercializadas as vacinas convencionais que baseiam-se preferencialmente em patogéneos mortos, subunidades de patogéneos ou vírus atenuados [34], mas que apenas aplicam-se a um número demasiado pequeno de doenças. E assim, doenças mortais como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a Hepatite C e a malária ainda continuam sem resolução clínica [30], representando um grande problema mundial. Tendo em conta que a prevenção destas doenças é essencial na saúde pública torna-se urgente compreender melhor a patologia do ponto de vista molecular, a fim de desenvolverem-se novas vacinas, mais estáveis e eficientes [1,33].

As vacinas de DNA surgiram no início de 1990 [1,11,30,34] e consistem na aplicação de um vetor, como por exemplo os plasmídeos de origem bacteriana, que tem como função o transporte do gene terapêutico [32,35], com a finalidade de induzir uma resposta imunitária [36]. O mecanismo pelo qual atua uma vacina de DNA (Figura 2) é interessante devido à capacidade de desencadear uma forte e duradoura resposta imune, humoral e celular, contra o agente patogénico [11,29]. O vetor entra no núcleo da célula onde inicia a transcrição do gene, e posteriormente no citoplasma ocorre a tradução na proteína desejada [1,11,33]. A proteína será processada e apresentada pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas (DC), no complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Como tal, as células T citotóxicas (células T CD8+) reconhecem o antígeno exposto no complexo MHC de classe I, sendo ativadas. Consequentemente, e após ativação, estas células desempenham um papel fundamental na resposta imunológica, pois secretam citocinas que contribuem para a otimização da ativação das APCs, aumentando o seu potencial microbicida. Assim, desenvolve-se outro tipo de resposta imunitária celular ao promover-se o reconhecimento do antígeno, apresentado pelo MHC de classe II, às células T auxiliares (células T CD4+). Posteriormente, a ativação destas células auxiliares contribui para a

sobrevivência das células B, produção de anticorpos e auxiliam os linfócitos T nas respostas citolíticas [31,33,35]. Também é possível desencadear-se uma resposta humoral, pois as células B reconhecem o antígeno presente no meio extracelular, induzindo a produção de anticorpos e de células de memória, o que torna-se fundamental para desenvolver-se uma resposta mais rápida e eficaz, numa posterior exposição ao agente patogénico [1,11,31,32].

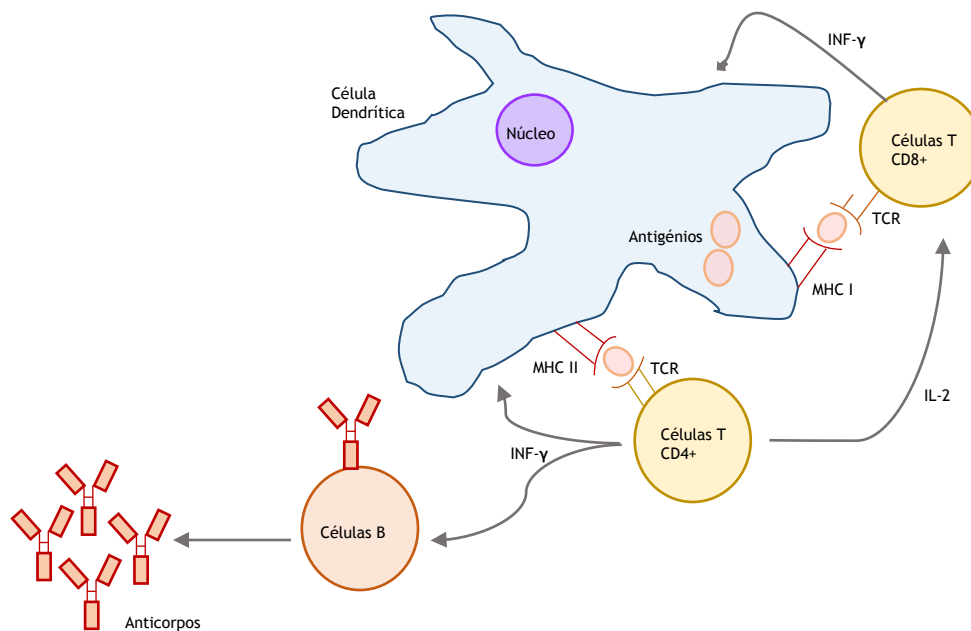


Figura 2. Representação esquemática das vias de apresentação de antígeno (adaptado de [32,33]).

Esta nova estratégia de imunização tem evoluído nos últimos anos, revelando vantagens comparativamente às vacinas convencionais, nomeadamente por apresentar maior segurança, estabilidade [30,32,34], capacidade de induzir uma diversidade de respostas imunes, entre outras (Tabela 1) [1,37]. Porém, estas vacinas são também pouco imunogénicas o que pode dever-se à baixa eficiência de transfecção ou expressão insuficiente do antígeno (Tabela 1) [1,33,36]. Assim, os estudos a decorrer na área das vacinas centram-se na compreensão do seu mecanismo de ação com a finalidade de desenvolver estratégias que superem a reduzida imunogenicidade [32,35], nomeadamente com a utilização de adjuvantes e com novas abordagens de transporte [36,37].

Tabela 1. Vantagens e desvantagens das vacinas de DNA (adaptado de [1,32]).

<u>Vantagens das Vacinas de DNA</u>	<u>Desvantagens das Vacinas de DNA</u>
São baratas	Baixa imunogenicidade
Apresentam persistência a longo prazo	Risco de alteração celular após inserção de DNA estranho
Reduzido risco de infecção	Induzem a produção de anticorpos contra DNA
Permitem a apresentação de antígeno por MHC de classe I e MHC de classe II, induzindo a resposta imune humoral e celular	
O processo de desenvolvimento e produção é conhecido e relativamente simples	
A resposta imune é focada exclusivamente no antígeno de interesse	
Têm estabilidade, facilitando o armazenamento e transporte	
São mais seguras, mais estáveis e fáceis de manusear	
É possível o desenvolvimento de vacinas multivalentes, num mesmo vetor	

Nos últimos anos já realizaram-se mais de 100 ensaios clínicos de forma a testar a eficácia das vacinas de DNA, nas doenças virais e não virais [36,37]. Tal como demonstrado na figura 3, a maioria dos ensaios são direcionados para o cancro, na tentativa de inibir o crescimento das células cancerígenas [34,36]. Porém, a investigação também contempla o desenvolvimento de vacinas que sejam adequadas para a malária, a tuberculose, entre outras [29]. Apesar dos resultados promissores em modelos animais [31,36], a eficácia da vacinas de DNA em humanos ainda continua por resolver, sendo por isso um problema imunológico merecendo particular atenção, pois a saúde pública deve ser uma prioridade [34,35].

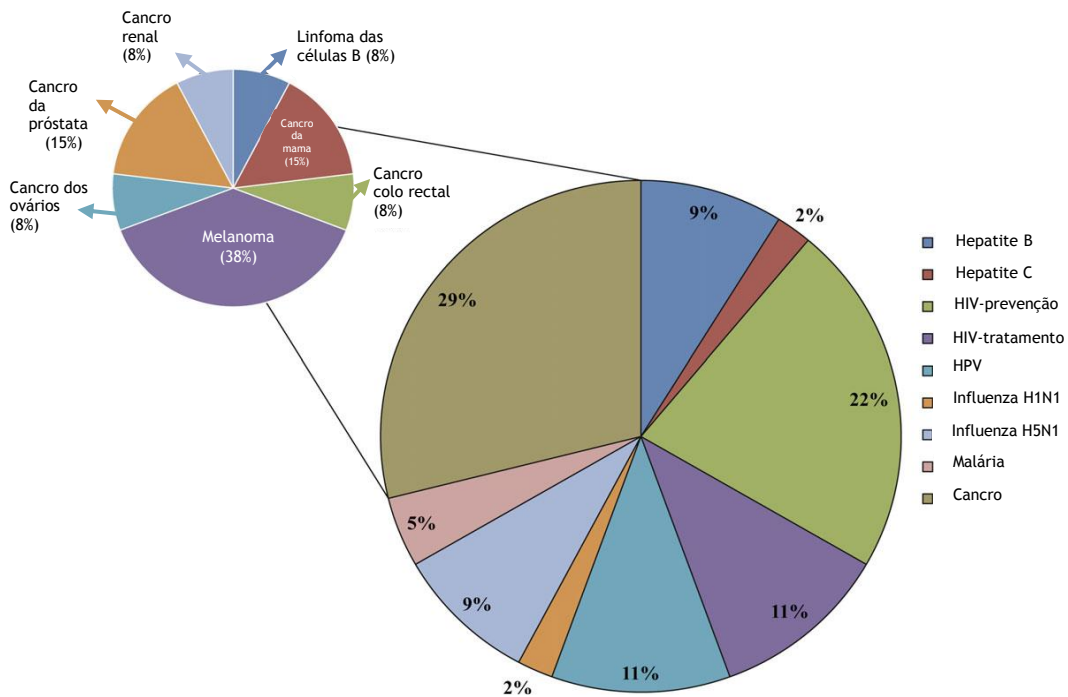


Figura 3. Esquemática dos ensaios clínicos a decorrer atualmente na área das vacinas de DNA (adaptado de [34]).

1.1.3 Vetores virais e vetores não virais

A terapia génica e as vacinas de DNA requerem a utilização de vetores de expressão seguros e eficientes [3,26]. Vários sistemas de entrega de genes estão disponíveis, contudo todos eles apresentam vantagens e limitações [38], pois se uns são mais seguros, outros revelam maior eficácia [9]. Como tal, continua a ser essencial a sua otimização para que sejam cumpridas as normas impostas pelas autoridades reguladoras, como a “Food and Drug Administration” (FDA) e a Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos (EMA) [39].

Assim, o vetor deve ser:

1. Imuno e biocompatível, a fim de evitar a degradação por nucleases e a deteção por fagócitos;
2. Capaz de atravessar a membrana plasmática e entrar no núcleo, onde ocorrerá a transcrição;
3. Seguro e não causar nenhum efeito nocivo [26,27,40].

Atualmente os vetores podem ser divididos em duas categorias distintas: os vetores virais e os vetores não virais [12,25,41].

1.1.3.1 Vetores virais

Os primeiros ensaios utilizando o vírus para entrega de material genético iniciaram-se em 1990 e atendendo ao sucesso obtido continuou a utilizar-se este sistema de entrega de genes [42,43]. Assim, o vírus representa o tipo de vetor mais utilizado na terapêutica à base de DNA, tal como observado na figura 4 [4,7]. A vasta aplicação desta metodologia deve-se aos avanços tecnológicos e a um maior conhecimento sobre virologia molecular, que permitiu melhorar o perfil de segurança destes vetores [42,44].

O ciclo de vida do vírus divide-se em duas fases principais, nomeadamente a infeção e a replicação. A infeção consiste na capacidade de reconhecer a célula-alvo, permitindo a sua entrada no hospedeiro. Já a replicação abrange uma cascata de expressão génica viral. Assim, no contexto de vetor viral é essencial manter a grande vantagem de evasão da célula eucariótica, permitindo transferir e expressar a informação genética no alvo [17,42]. Porém, é fundamental alterar a segunda fase do seu ciclo de vida, de forma a impedir a replicação do vírus infeccioso. Como tal, o genoma viral sofre uma modificação génica de modo a eliminar os genes essenciais à replicação e patogenicidade, substituindo-os pelos genes terapêuticos [42,43].

Existem vários vetores virais não integrantes e integrantes, nomeadamente os adenovírus e vírus adeno-associado e os retrovírus e lentivírus, respetivamente [17]. Os adenovírus são vírus de DNA de cadeia dupla [23] sendo os mais usados no contexto clínico [10], pois apresentam baixa patogenicidade e elevada capacidade de expressão proteica [4]. Estes vetores têm capacidade de infetar vários tipos de células e são de fácil produção [17]. Contudo, apresentam uma elevada imunogenicidade podendo desencadear uma resposta imune no hospedeiro [38,42,45]. Os vetores adeno-associados são pequenos vírus de DNA de cadeia simples e cuja replicação está dependente da infeção por um vírus auxiliar [46]. Ao contrário dos anteriores, possuem baixa imunogenicidade e patogenicidade, reduzida resposta imune pelo hospedeiro e elevada estabilidade [42,46,47]. Porém, têm como desvantagem a limitação relativa ao tamanho do gene terapêutico a transportar [17,47]. Os retrovírus foram os primeiros vetores virais a serem descritos [17]. Nestes caso, os retrovírus comprometem em muito a segurança, pois integram aleatoriamente o genoma da célula hospedeira o que pode desencadear graves problemas de saúde. Porém, devido às vantagens inerentes como baixa patogenicidade, alta eficiência de infeção e facilidade de manipulação continuam a ser feitos estudos de modo a melhorar a sua segurança [4,42]. Os lentivírus atuam numa grande variedade de células e apresentam um risco reduzido de mutagénese insercional, pois tendem a integrar longe de promotores, apresentando, no entanto, ainda algum potencial de patogenicidade [42].

Atendendo ao descrito anteriormente, conclui-se que os vetores virais têm uma alta capacidade de transfecção, contudo as questões de segurança comprometem a utilização destes vetores, nomeadamente devido à possível replicação do vírus, à indução de

mutagênese insercional que poderá causar inativação de genes supressores de tumores e ativação de oncogenes [24,38], e respostas imunitárias indesejáveis [16,20,21]. Assim, devido a uma necessidade intrínseca de ultrapassar estas limitações, surgiram os vetores não virais [22,45,48].

1.1.3.2 Vetores não virais

Na tentativa de colmatar os problemas associados aos sistemas de entrega virais surgiram os vetores não virais [5,8,49], que conseguem melhorar algumas características particularmente na segurança e na capacidade de transferir genes de tamanho superior [9,21,50]. Os vetores não virais são também mais fáceis de produzir, com custos associados mais reduzidos e são mais estáveis [11,28,51]. Nos últimos anos, estes novos sistemas despertaram um grande interesse para a aplicabilidade na terapêutica à base de DNA, representando, em 2012, 25% de todos os ensaios clínicos (Figura 4) [2,10,25,38,52]. Neste caso, a entrega do gene terapêutico pode realizar-se recorrendo a diferentes classes de vetores, nomeadamente plasmídeos, cosmídeos e cromossomas artificiais [50].

Dos referidos anteriormente, o DNA plasmídico (pDNA) é considerado o vetor mais promissor na terapêutica, e está a ser profundamente estudado no contexto da tecnologia de DNA recombinante [13,48,50,51]. Este vetor não viral consiste numa molécula de DNA de cadeia dupla, covalentemente fechada [9,21,22,25]. Sabe-se que para uma entrega eficiente do gene pelo método não viral, o vetor tem de ter a capacidade de superar barreiras celulares [7,16,48]. Porém, o pDNA é uma macromolécula hidrofílica e que exibe carga negativa, apresentando por isso propriedades físico-químicas que limitam a absorção celular, resultando numa eficiência de transfecção mais diminuída e em baixos níveis de expressão génica [20-22]. Por outro lado, durante a entrega celular, este ácido nucleico está sujeito a uma diversidade de fatores ambientais, nomeadamente o pH e exposição a enzimas, que podem promover a sua degradação [7,21].

Na tentativa de colmatar estas limitações, promover a sua proteção e manter a estabilidade da molécula, são utilizados diferentes métodos físicos e químicos para a sua entrega às células-alvo [4,26,27,53].



Figura 4. Vetores utilizados nos ensaios de terapia gênica (adaptado de [25]).

1.1.3.2.1 Métodos físicos

As terapêuticas à base de DNA têm evoluído nos últimos anos para o tratamento de diversas doenças, porém a sua aplicabilidade, *in vivo*, ainda é restrita devido aos obstáculos intra e extracelulares [7]. Para possibilitar a ação terapêutica é fundamental haver a internalização dos ácidos nucleicos, mas devido às propriedades físico-químicas do DNA este processo é limitado [7,27]. Assim, desenvolveram-se vários métodos físicos com a finalidade de superar as barreiras fisiológicas para a entrega de DNA [26,34]. O método mais simples consiste no uso de seringa e agulha, designa-se por injeção direta e baseia-se na injeção direta de DNA com aplicabilidade *in vitro* e *in vivo*. Apresenta baixa toxicidade, mas não é eficaz em todos os tecidos e limita a expressão gênica na célula-alvo [4,16].

Outro método é a injeção balística de DNA que consiste na aplicação de microesferas de ouro, revestidas com DNA, que são bombardeadas através de um gás pressurizado para as células-alvo. A eficiência desta técnica depende do tamanho das partículas e da velocidade de injeção [16], e de modo a promover um melhor revestimento das partículas de ouro poderá elaborar-se uma modificação química à sua superfície [32,40]. Este método é simples e permite a utilização de uma menor quantidade de pDNA [32], além de proporcionar um direcionamento eficaz às células apresentadoras de antígenos [37]. Porém, a utilização desta técnica não é totalmente segura e a expressão do gene é temporária, sendo mais aplicada a tecidos superficiais [4,34,40,41].

Dos métodos físicos, o mais utilizado é ainda a eletroporação [32,54] que baseia-se na aplicação de uma série de impulsos elétricos, curtos e intensos, que criam poros na

membrana celular [4,34,41]. Esta destabilização celular facilita a entrada e absorção do DNA, e conseqüentemente melhora a expressão do gene terapêutico [30,34,40]. A eletroporação tem como principais vantagens a possibilidade de ser aplicada em vários tipos de células, ser um método seguro e reprodutível [16]. Mas tal como todos os métodos tem as suas desvantagens, como o facto da estabilidade do DNA ser afetada pela voltagem aplicada, e principalmente ter uma área de transfecção limitada havendo necessidade de intervenção cirúrgica para tratamento de órgãos mais internos [16,40].

Um outro método ainda não completamente explorado é o ultrassom que permite aumentar a permeabilidade da membrana, apresentando potencial para entrega direcionada de genes, mas exibindo uma baixa eficácia *in vivo* [4,40]. Contrariamente ao método anterior não é invasivo [16].

Por último, a injeção hidrodinâmica pode também ser aplicada, sendo um método simples que consiste na administração intravenosa de uma solução de DNA, num volume elevado, através da aplicação de uma alta pressão hidrostática [16,41,45]. Este método permite melhorar a expressão génica no tecido muscular, é simples e seguro, apesar de serem também reconhecidas algumas limitações [40,41]. De uma forma geral, as estratégias descritas ainda não promovem a segurança exigida para possível aplicação clínica, requerendo estudos e otimizações adicionais [7,54].

1.1.3.2.2 Métodos químicos

Para além dos métodos físicos, outros métodos designados de químicos têm sido explorados a fim de proteger o material genético e de proporcionar um melhor direcionamento da entrega de genes às células-alvo [26,27]. Um dos métodos químicos mais usados consiste na utilização de lípidos catiónicos que são fáceis de produzir, de baixo custo e de baixa toxicidade [7,16,41]. Existe uma grande diversidade destes lípidos, sendo que a sua estrutura química influencia a eficiência de transfecção [40]. Este método consiste na utilização de lípidos catiónicos, carregados positivamente, possibilitando a associação com o DNA, carregado negativamente, que conseqüentemente será protegido de degradação enzimática. Por outro lado, estes sistemas permitem melhorar o processo de transfecção, pois apresentam carga positiva que facilita a entrada na célula, por endocitose [16,40]. Apesar destas importantes vantagens, mais estudos devem ser realizados neste âmbito uma vez que estes sistemas podem desencadear respostas imunes graves, apresentam atividade limitada *in vivo* e podem ser tóxicos [7,40], sendo que a entrada do ácido nucleico no núcleo é ainda um obstáculo [16].

Outro método químico que tem sido alvo de numerosos estudos consiste no uso de polímeros catiónicos. Também neste caso existe uma diversidade de polímeros que poderão ser

utilizados, nomeadamente os polímeros naturais como o quitosano, polipéptidos como a poli-L-lisina (PLL) e a poli-arginina, e outros polímeros como a polietilenimina (PEI), que é a mais estudada para a entrega génica [28,40,55]. Estes polímeros apresentam uma elevada densidade de grupos amina na sua constituição permitindo formar complexos por interações electrostáticas com os ácidos nucleicos, carregados negativamente. Assim, este complexo terá uma maior estabilidade permitindo facilitar a entrada de DNA por endocitose e protegendo a biomolécula da degradação por nucleases [16,23,40]. Contudo, têm como desvantagens o facto de poderem desencadear toxicidade celular e respostas imunes agudas [28,40]. Algumas modificações químicas podem ser realizadas a fim de melhorar a capacidade de transfecção [16,40,55], nomeadamente com a associação de polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG) [28].

Assim, conclui-se que existem vários métodos não virais para a entrega de genes, mas nenhum apresenta total segurança e elevada eficiência de transfecção para poder ser aplicado na terapia à base de DNA. Assim, a aplicação destes sistemas na terapêutica é bastante limitada e exige que se continue a explorar a sua otimização para que seja possível melhorar as suas propriedades e conduzir à aplicação.

1.2 Tecnologia de DNA plasmídico

O DNA plasmídico tem despertado um contínuo interesse para a sua utilização na terapia génica e nas vacinas de DNA [2,14,52]. Consiste numa molécula de DNA circular, de cadeia dupla, sendo principalmente produzido e isolado recorrendo a processos biotecnológicos, usando sistemas procarióticos como hospedeiros [9,22,41]. Os plasmídeos são utilizados como vetores de forma a promover a entrega do gene terapêutico nas células-alvo onde será expressa a proteína de interesse para o tratamento de uma determinada doença [29,34,56]. O interesse nesta biomolécula deve-se às vantagens que lhe são inerentes, nomeadamente o facto de serem mais seguros [27,50], menos tóxicos [53] e de serem menos propensos a desencadear uma resposta inflamatória e imunológica no hospedeiro [26,57]. Assim, este vetor de expressão será uma alternativa benéfica e eficaz para ser aplicado no futuro tratamento de doenças incuráveis [3,11,58,59]. Contudo, existem limitações na utilização deste vetor, pois a eficiência de transfecção é reduzida, limitando os níveis de expressão do transgene [26,53], o que resulta na produção de baixos níveis da proteína de interesse [12,60]. Uma das estratégias exploradas para aumentar os níveis de expressão tem sido o isolamento e aplicação da isoforma superenrolada (sc) do DNA plasmídico, pois é considerada a conformação biologicamente ativa para a transferência génica [6,20,61]. A conformação sc do DNA plasmídico é a mais compacta, apresenta maior estabilidade [2,62,63] e tem um melhor acesso ao núcleo da célula facilitando a expressão génica [63,64]. No entanto, existem outras isoformas como a circular aberta (oc) e a linear, que são consideradas

impurezas por apresentarem reduzida eficácia de transfecção [5,52]. Estas conformações surgem devido ao corte de uma única cadeia ou da cadeia dupla da isoforma sc, respetivamente [61,65]. São vários os fatores que poderão contribuir para a existência destas isoformas, nomeadamente a sequência de DNA e as condições ambientais, como temperatura elevada, extremos de pH [3,9] ou ação de enzimas [20].

Para ser possível utilizar esta tecnologia recente à base de DNA será fundamental a implementação de processos adequados à obtenção de DNA plasmídico com a qualidade necessária [58]. Segundo as autoridades reguladoras, como a FDA, será essencial ter em conta todos os critérios de qualidade em termos de contaminantes, sendo que a preparação final deve apresentar uma quantidade de isoforma sc superior a 97% [6,9,13]. Assim, será essencial desenvolver estratégias de purificação que permitam isolar a isoforma sc das outras topologias, para possível aplicação terapêutica [5,22,64,65].

1.2.1 Processo “Upstream”

Tal como referido anteriormente, estão a ser realizados diversos ensaios clínicos usando o pDNA como vetor, com o intuito final de tratar doenças de etiologia complexa [58]. Uma das condições cruciais para que o pDNA possa ser utilizado como novo produto biotecnológico é o desenvolvimento de processos que sejam viáveis e económicos, e que permitam produzi-lo em quantidades elevadas, cumprindo as exigências das entidades reguladoras, tais como a FDA e a EMEA [12,14,39,65]. Assim, atualmente impõe-se a necessidade de produção em larga escala, com elevado grau de pureza e de implementação de técnicas adequadas à avaliação da qualidade do vetor [10,25,62].

Tal como representado na figura 5, a estrutura do plasmídeo divide-se em duas regiões principais: a unidade de transcrição eucariótica e a unidade de amplificação bacteriana [59,66,67]. A unidade de amplificação contém: i) a origem de replicação (ori) que é crucial para que ocorra a replicação do vetor de forma estável e em quantidades adequadas, ii) a marca de seleção que geralmente consiste no gene que confere resistência a um antibiótico, para possibilitar a seleção das células transformadas com o vetor [29,41,59] e iii) os motivos CpG não metilados que consistem em sequências de DNA constituídas por citosinas e guaninas, ligadas por ligações fosfodiéster, e que são necessários na ativação do sistema imunológico [24], e na apresentação e processamento de antígenos [9,29].

Já a unidade de transcrição é a região do plasmídeo que contém o gene de interesse para posterior expressão na célula eucariótica e que contém os elementos reguladores, como os promotores, os potenciadores e a sequência de terminação da poliadenilação (PolyA), que é essencial na estabilização dos transcritos [32] e na proteção contra a degradação do RNA [41,59,66].

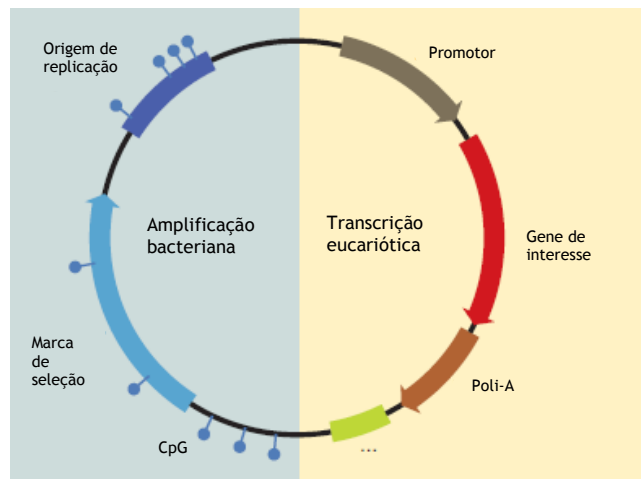


Figura 5. Representação da estrutura geral do DNA plasmídico (adaptado de [41]).

Um processo biotecnológico para produção de DNA recombinante inclui o processo de desenho e construção do vetor, a escolha do hospedeiro, a fermentação e o processo “Downstream”, tal como retratado na figura 6 [5,21,58].

A síntese do pDNA é um passo extremamente importante para assegurar o sucesso do processo global [12,27] e é relativamente fácil de executar [29]. Uma das etapas fundamentais para garantir a integridade e a eficiente produção do pDNA é a escolha da estirpe bacteriana [9,25]. De facto, a seleção do hospedeiro irá interferir com o rendimento de produção do vetor [12,61], a proporção das isoformas e a quantidade de impurezas, particularmente de endotoxinas [14,20,39]. Todavia, durante a escolha, também há que ter em consideração o balanço entre o custo e o benefício, a facilidade de manipulação e de crescimento do hospedeiro, a capacidade de suportar um elevado número de cópias de pDNA, entre outras. Assim, e dentro dos vários hospedeiros possíveis, o mais utilizado para a produção do pDNA é a *Escherichia coli* (*E. coli*) [25,61]. Este sistema é o que reúne as melhores características para uma produção eficiente, além de ser o mais estudado o que possibilita um conhecimento do perfil genético mais aprofundado [11,29,57]. Porém, atualmente alguns estudos centram-se no desenvolvimento de novos sistemas hospedeiros [14].

Após a construção do vetor e a seleção do sistema hospedeiro são otimizadas as condições de crescimento celular. Estas condições de fermentação devem ser consideradas já que poderão interferir quer com a estabilidade do plasmídeo, quer com a fisiologia da célula [12,20,25]. Assim, o processo deverá ser otimizado a fim de promover uma elevada densidade celular [22], pois quanto mais eficiente for este processo maior será a produtividade do pDNA, e consequentemente maior será o rendimento após o processo “Downstream” [14]. Sabe-se que a presença do vetor na célula hospedeira cria um “stress” metabólico que poderá influenciar o rendimento de produção e afetar a estabilidade do plasmídeo [12,14], pelo que as condições devem ser selecionadas de forma a controlar estes parâmetros [10,25].

Concluída a etapa de produção terá de proceder-se à otimização das condições de isolamento e de purificação. De realçar, que é fundamental otimizar todos os passos do processo, inclusive os passos iniciais, pois o processo “Downstream” irá ser fortemente influenciado pelas etapas anteriores [14,29,39]. Por outro lado, o sucesso da transfecção e da expressão génica é amplamente afetado pelo processo de produção e purificação [62]. Em suma, será crucial ajustar todas as condições de produção para que seja possível melhorar o desempenho da estratégia biotecnológica e assim garantir a estabilidade estrutural e funcional do pDNA [60,62].

1.2.2 Processo “Downstream”

De modo a preparar um vetor que obedeça às normas impostas pelas autoridades reguladoras, nomeadamente no que diz respeito ao teor de isoforma sc do pDNA, será essencial realizar um processo de purificação. Esta etapa permite eliminar o DNA genómico (gDNA), o RNA, as proteínas, as endotoxinas e minimizar a presença de pDNA desnaturado e das isoformas oc e linear [52,57,58]. Este procedimento é de bastante relevância, pois os componentes celulares descritos anteriormente poderão ser tóxicos e desencadear efeitos biológicos indesejáveis, contribuindo assim para uma reduzida eficiência de transfecção [5,11,20]. Sabe-se, por exemplo, que a presença de gDNA numa amostra de plasmídeo provoca necrose nas células do músculo-esquelético [48].

A lise celular é o primeiro passo envolvido no procedimento “Downstream” [62], e que pode ser realizada através de métodos mecânicos ou químicos [21,61]. A lise alcalina é o método mais utilizado em investigação, que tem como finalidade promover a libertação de todos os componentes intracelulares, como o RNA, as endotoxinas, as proteínas, o gDNA e o pDNA [5,29]. Este processo baseia-se na utilização de soluções básicas, que promovem modificações ao nível da membrana celular [20,29]. Assim, o hidróxido de sódio (NaOH) desnatura as proteínas que estão envolvidas na manutenção da membrana celular, através da quebra das ligações de hidrogénio, permitindo a libertação dos componentes celulares. Por outro lado, este agente induz um aumento de pH causando a desnaturação do gDNA e degradando o RNA [29]. Posteriormente, ocorre a formação de um precipitado com as proteínas e o gDNA desnaturado, por adição de um tampão de neutralização que contém uma alta concentração de acetato de potássio [21,29]. Este processo é considerado um passo crítico da recuperação do plasmídeo, sendo fundamental ter cuidados de forma a minimizar as perdas de plasmídeo e a alteração da sua conformação superenrolada, promovendo, no entanto, a precipitação eficiente de gDNA que facilita a sua remoção [20,48]. Todavia, estes passos não são suficientes para eliminar todas as impurezas, e por isso poderá efetuar-se posteriormente uma precipitação com isopropanol, com a finalidade de concentrar o plasmídeo [22,29]. De seguida, e com o objetivo de remover as impurezas de elevado peso molecular como o RNA,

as proteínas e as endotoxinas pode realizar-se uma precipitação com um sal, como o sulfato de amónio [21,52,58].

Por último, é essencial aplicar uma técnica cromatográfica (Figura 6) para proceder-se à purificação final do pDNA. A cromatografia tem evoluído nos últimos anos, sendo considerada um dos métodos de purificação mais eficazes na obtenção de pDNA de elevada qualidade, que cumpre os critérios estabelecidos pelas agências reguladoras [39,62].

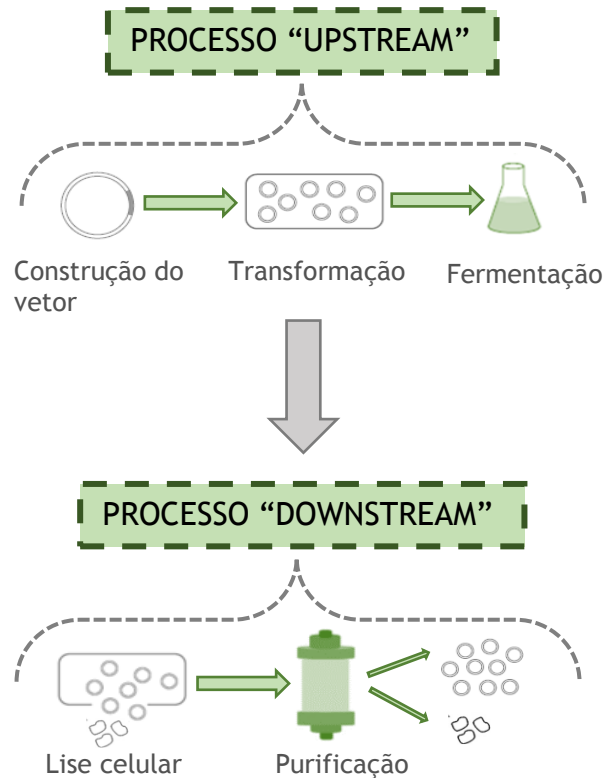


Figura 6. As etapas fundamentais dos processos “Upstream” e “Downstream” para a obtenção do pDNA puro (adaptado de [21,48]).

1.2.3 Purificação de pDNA

Para proceder-se à aplicação terapêutica da biomolécula de interesse é crucial realizar-se a sua purificação [61,64], pois um produto terapêutico deverá ter um elevado grau de pureza [22,65]. Esta etapa requer a aplicação de um processo que permita a obtenção do pDNA em larga escala, e que cumpra com os critérios definidos pelas agências reguladoras, em termos de especificidade, eficácia, pureza e segurança [20,22].

Especificando os critérios exigidos pela FDA relativamente à preparação de pDNA é indicado que (Tabela 2):

- A quantidade de isoforma superenrolada deve ser superior a 97%;
- A quantidade de DNA genómico deve ser inferior a 2 ng/µg de plasmídeo;

- A quantidade de endotoxinas deve ser inferior a 0,1 EU/ μ g de plasmídeo;
- O RNA deve ser indetetável;
- As proteínas devem ser indetetáveis [5,48,64].

Tabela 2. Especificações que determinam a pureza e segurança do pDNA para aplicação terapêutica (adaptado de [22,39]).

<i>Caraterísticas</i>	<i>Especificações</i>	<i>Método analítico</i>
<i>Aparência</i>	Solução límpida e incolor	Observação visual
<i>pDNA</i>	>97% sc	HPLC
<i>Proteínas</i>	Não detetável	Método BCA
<i>RNA</i>	Não detetável	0,8% gel de agarose
<i>gDNA</i>	<2 ng/ μ g de plasmídeo	PCR
<i>Endotoxinas</i>	<0,1 EU/ μ g de plasmídeo	Teste LAL

A cromatografia é o processo mais adequado para a purificação do pDNA, pois permite a obtenção da amostra pura ao eliminar impurezas, nomeadamente o gDNA, o RNA, as endotoxinas e o plasmídeo oc e linear [5,21,52]. No entanto, este procedimento é dificultado por existir uma similaridade estrutural entre as impurezas e o plasmídeo, e pela sua estrutura complexa e dinâmica [11,14,62]. Assim, é extremamente importante ter em consideração as propriedades das biomoléculas que pretende-se separar, a fim de utilizar-se uma técnica que permita estabelecer as interações específicas entre a molécula-alvo e o ligando da matriz [20,22]. As propriedades das biomoléculas a considerar são o tamanho, a carga, a hidrofobicidade, a conformação e a acessibilidade dos grupos moleculares específicos [22,39,68].

Os processos atuais de purificação de pDNA promovem o seu isolamento, mas representam a etapa que mais encarece o procedimento para a obtenção de vacinas de DNA, pois envolve a utilização de vários passos [65]. Assim, tem-se tentado otimizar este processo de forma a assegurar a estabilidade estrutural e funcional da conformação ativa do pDNA [68] e, ao mesmo tempo, criar separações mais rápidas e eficientes, com o máximo de rendimento de recuperação [52,62].

1.2.3.1 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Esta técnica permite a separação de contaminantes e a consequente purificação do pDNA, com base nas diferenças de tamanho molecular. Assim, moléculas de menor tamanho como o RNA e as endotoxinas eluem mais tarde, pois conseguem entrar no interior dos poros da

coluna. Já as moléculas de maior dimensão como o gDNA e o pDNA são as primeiras a eluir. Apesar desta técnica promover a separação entre o plasmídeo e o RNA, tem como desvantagem inerente a reduzida seletividade entre as isoformas do pDNA e entre o pDNA e o gDNA [69].

1.2.3.2 Cromatografia de troca aniónica (AEC)

Este processo cromatográfico consiste na separação de biomoléculas com base na carga, sendo possível devido à natureza polianiónica do pDNA [20,22]. Neste caso, a interação ocorre entre os grupos fosfato do pDNA, carregados negativamente, com o ligando da fase estacionária, carregado positivamente. Geralmente, os ligandos são aminas quaternárias e as interações que predominam são eletrostáticas [39,62]. A eluição ocorre por aumento da concentração de sal, sendo que as moléculas de menor densidade de carga serão as primeiras a serem eluídas. De notar que o tamanho e a conformação da biomolécula afetam o padrão de eluição [22]. Esta técnica apresenta boa seletividade entre o pDNA e os contaminantes [39,69], pois a isoforma sc do pDNA tem uma densidade de carga maior por área de superfície, o que faz com que seja eluída mais tarde do que as restantes isoformas oc e linear. Para além disso, a técnica é também ideal para a remoção de RNA e de proteínas [22]. Porém, tal como referido anteriormente, semelhanças físicas e químicas entre as impurezas e o pDNA dificultam o processo de separação, e nesta técnica isso poderá acontecer, por exemplo, na separação entre o plasmídeo e as endotoxinas [20].

1.2.3.3 Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)

O princípio desta técnica baseia-se na interação hidrofóbica entre a molécula-alvo e o ligando da fase estacionária, e beneficia da maior hidrofobicidade dos ácidos nucleicos de cadeia simples para promover a separação [22,39]. Para a retenção das biomoléculas é necessário a utilização de um tampão com elevada concentração de sal, pois a força iónica é responsável por remover moléculas de água à volta dos grupos hidrofóbicos, favorecendo a interação entre a biomolécula e o ligando. Posteriormente, a ordem de eluição depende do grau de hidrofobicidade da molécula-alvo [39], e ocorre quando reduz-se o teor de sal. Assim, esta técnica cromatográfica é eficiente na separação do RNA e de endotoxinas, contudo apresenta baixa seletividade em relação às diferentes isoformas do pDNA.

1.2.3.4 Cromatografia de afinidade (AC)

Esta técnica baseia-se num bioreconhecimento específico entre o ligando do suporte cromatográfico e a biomolécula-alvo, com base na sua função biológica e/ou na sua estrutura química [39,62,70]. Ao utilizar esta técnica são promovidas interações fortes, mas reversíveis entre o ligando e a molécula-alvo [68,71], sendo que o reconhecimento resulta da combinação de vários tipos de forças intermoleculares, nomeadamente interações eletrostáticas, hidrofóbicas, pontes de Hidrogénio, catião- π , de van der Waals, entre outras [68,71].

Para melhorar o rendimento de recuperação, os ligandos devem ser otimizados e selecionados para serem estáveis, seletivos, e facilitarem o estabelecimento de interações com a molécula-alvo [70]. Após a retenção da amostra poderá ser estabelecida uma estratégia de eluição específica ou não-específica, isto é poderá ser utilizado um ligando competitivo ou serem modificadas as condições do tampão, nomeadamente o pH, a polaridade ou a força iónica [62,71,72].

A cromatografia de afinidade é considerada a técnica mais específica e por isso a mais adequada para a recuperação da isoforma sc do pDNA, permitindo o seu isolamento das restantes isoformas e de outras impurezas. Uma das limitações reside no facto desta técnica cromatográfica ser a mais cara devido ao passo de desenho e obtenção dos ligandos, contudo como será possível a eliminação de algumas etapas a jusante, melhorando a qualidade do produto final, os custos associados à preparação da matriz podem ser compensados [11,62].

1.2.4 Tecnologia monolítica

Apesar dos progressos conseguidos ao nível da purificação dos vetores de interesse ainda residem algumas limitações que condicionam os rendimentos obtidos [2]. Assim, e a fim de serem ultrapassados os obstáculos inerentes às matrizes convencionais, foram desenvolvidos mais recentemente os suportes monolíticos. Estes suportes consistem num material sólido altamente poroso, cujo tamanho depende da temperatura de polimerização [61], e representam as mais recentes fases estacionárias de cromatografia para a purificação de biomoléculas.

Os ligandos usados nas matrizes de afinidade são geralmente agentes biológicos, como enzimas, anticorpos, péptidos, aminoácidos e lectinas [64,71]. A melhor capacidade dos monolitos para separar e purificar biomoléculas, com maior rendimento e grau de pureza, resulta das suas características, nomeadamente as suas excelentes propriedades de transferência de massa e alta capacidade de ligação de biomoléculas grandes como o pDNA [11,61,64,73]. Por outro lado, os monolitos promovem uma separação mais rápida e reprodutível, minimizando o tempo de contacto da amostra com o suporte [62], e

consequentemente diminuindo a possibilidade de ocorrerem alterações estruturais e possível degradação do pDNA [5].

A aplicabilidade das colunas monolíticas tem evoluído, pois revelam ser uma excelente alternativa para a purificação de pDNA, comparativamente às matrizes convencionais [2], e podem ser aplicadas quer em pequena escala (analítica ou preparativa), quer a nível industrial [62].

1.2.5 Inconvenientes do pDNA, na abordagem terapêutica

Nos últimos anos os trabalhos de investigação têm-se focado fortemente no potencial do pDNA como um vetor a utilizar na terapêutica à base de DNA devido às melhorias de segurança, comparativamente aos vetores virais [39,54]. Ainda assim, a sua segurança não é total e por isso continua a ser uma limitação a considerar [27,57].

Como descrito anteriormente, o plasmídeo é constituído por sequências bacterianas fundamentais para a sua replicação no hospedeiro [9], no entanto esta região pode representar uma limitação na aplicabilidade terapêutica [51,67,74,75]. Especificamente, os genes que conferem resistência a um antibiótico podem disseminar-se para a flora bacteriana humana, através de uma transferência horizontal de genes, colocando em risco a segurança biológica [59,76-78]. Por outro lado, há possibilidade de desencadear reações alérgicas [14,37,66]. Adicionalmente, os motivos CpG não metilados são desfavoráveis na aplicação em terapia génica porque são imuno-estimulantes, ao promoverem a ativação dos recetores Toll-Liker [27,74,77,78], afetando a expressão do gene terapêutico na célula-alvo e induzindo respostas inflamatórias e morte celular [26,41,63]. Após a entrada do pDNA na célula-alvo as sequências bacterianas podem associar-se às histonas formando uma estrutura de heterocromatina densa, sendo consequentemente criada uma inacessibilidade aos fatores de transcrição [24,26,60]. Logo, estas sequências contribuem para a redução ou silenciamento da expressão génica [12,20,93], comprometendo assim a eficácia do pDNA na terapia génica [30,45,79].

Outro componente da região bacteriana é a origem de replicação que poderá induzir respostas imunitárias adversas no hospedeiro e potenciar a oncogénese e efeitos genotóxicos, resultantes do potencial de integração cromossómica [27,57,63]. Por outro lado, a biodisponibilidade deste vetor fica comprometida devido ao seu elevado tamanho molecular [26,57]. Assim, e segundo as autoridades reguladoras, como a EMEA e a FDA, só a área de transcrição eucariótica terá interesse no futuro terapêutico e farmacêutico preventivo [41,51,59]. Para tal, mais recentemente foram desenvolvidos alguns ensaios com a finalidade de minimizar os efeitos adversos inerentes ao pDNA surgindo o DNA minicircular (mcDNA) [9,14,30,75].

1.3 DNA minicircular

O DNA minicircular foi isolado pela primeira vez por Cozzarelli, Kelly e Kornberg, a partir da *E. coli* T-15 [80,81]. Definiram-no como uma pequena molécula de DNA extracromossômico, à qual a informação genética estava limitada a um número muito pequeno de genes e cuja função biológica era desconhecida [81,82]. O interesse no conhecimento desta molécula foi evoluindo pelo que, a partir de uma diversidade de estudos de hibridação do mcDNA com o pDNA, concluíram que o mcDNA surge a partir de plasmídeos de tamanho molecular superior, por eliminação dos genes essenciais à manutenção e replicação bacteriana [81].

Portanto, o mcDNA é uma molécula de DNA circular [54,83] utilizado como vetor não viral na transferência de genes, sendo exclusivamente constituído por sequências eucarióticas [38,59,76,79,84]. Logo, estes vetores são mais seguros que o pDNA [83] e promovem um aumento do efeito terapêutico [9,18,50], sendo assim considerados uma alternativa promissora na aplicabilidade terapêutica [30,78,85].

1.3.1 Síntese do mcDNA

O mcDNA surge como um novo produto biotecnológico, na área da terapia à base de DNA, com perspectivas futuras benéficas nas abordagens terapêuticas [3,49,54,63]. A sua produção resulta da recombinação intramolecular, *in vivo*, do pDNA numa cultura bacteriana. Este processo induz a formação de duas ligações diferentes de recombinação permitindo a formação do mcDNA e do miniplasmídeo (mP) [38,41,51,59].

O mcDNA contém o gene terapêutico e o mP contém os elementos bacterianos [9,14]. Especificando, existem dois passos para realizar-se a produção do mcDNA [57,67], que consistem na replicação do plasmídeo parental (PP), seguida da produção do mcDNA e mP, por ação de uma recombinase [57,59,76].

Existem várias enzimas adequadas ao processo de recombinação, nomeadamente a família das recombinases lambda, que abrange a recombinase lambda, a recombinase Cre e a recombinase flp, e a família das recombinases serina, que inclui a integrase phiC31 e a par-resolvase [14,41,57]. O primeiro sistema de produção do mcDNA descrito na literatura apresentou várias desvantagens, nomeadamente a toxicidade da recombinase lambda para as células bacterianas [9,41] e uma recombinação reversível, o que promove a formação de estruturas multiméricas [51,79]. Portanto, Chen e os seus colaboradores optimizaram a biossíntese do mcDNA utilizando a recombinase serina phiC31 [24,85], pois esta enzima promove uma recombinação unidirecional [51,86], permite a obtenção de rendimentos mais elevados e custos mais reduzidos [3,76,84].

Tal como descrito anteriormente, do processo de indução/recombinação resulta a formação do mcDNA e do mP e ainda podem permanecer quantidades vestigiais de PP. Assim, e de modo a promover a eliminação do mP e PP (considerados contaminantes) durante o processo de indução, evitando a posterior aplicação de metodologias caras e de baixo rendimento para a sua degradação, Chen e seus colaboradores desenvolveram uma tecnologia que permite melhorar o processo de produção e isolamento. Neste processo foi utilizada a endonuclease Scel-I, que permite a eliminação das duas espécies contaminantes [50]. Especificando, na estrutura do PP, ilustrada na figura 7, observa-se a presença dos locais attB e attP que são os locais de ligação da recombinase e observa-se o local de ligação da endonuclease Scel-I (32 x Scel). Quer a recombinase quer a endonuclease Scel-I estão sob o controlo da L-arabinose (20% w/v) [76,84,87]. Assim, esta induz o promotor BAD.phiC31 a expressar a recombinase serina que promove a recombinação entre os sítios attB e attP, mediando-se assim a produção do mcDNA e do mP [76,78,86,87]. Simultaneamente, a endonuclease Scel-I é ativada e promove a destruição do mP e dos resíduos de PP [3,87-89]. Porém, quantidades vestigiais de mP e de PP resultantes do processo de recombinação, *in vivo*, podem ainda permanecer, sugerindo que a recombinação não foi completa [51,84]. Portanto, é necessário realizar-se a purificação para isolar o mcDNA e obter um vetor aplicável na terapêutica [9,52,59,76].

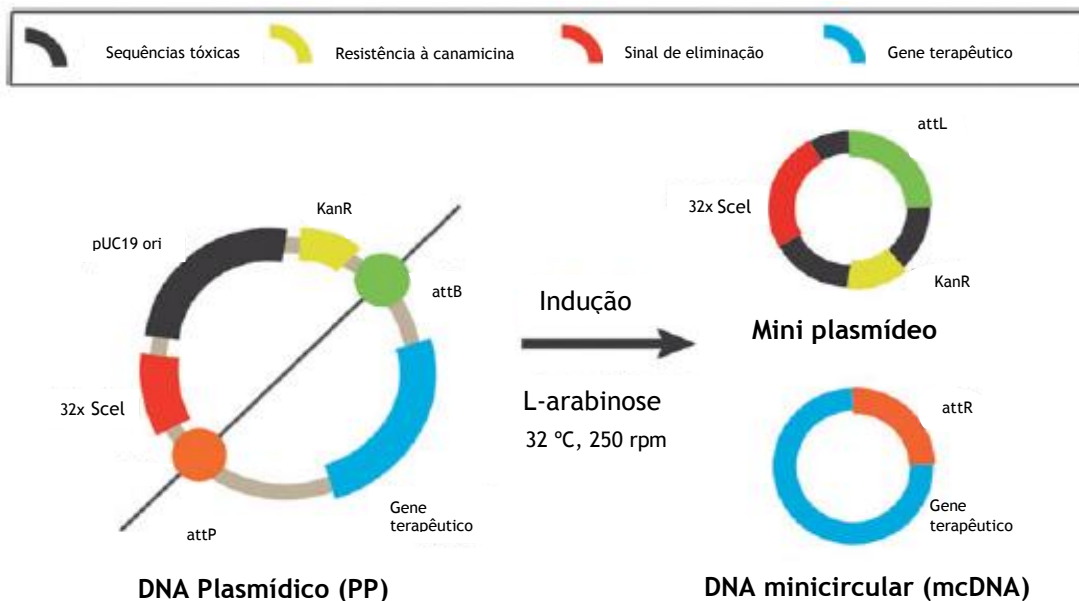


Figura 7. Esquema da produção do mcDNA, a partir do PP. A L-arabinose induz a ação da recombinase phiC31 que reconhece as sequências attB e attP, permitindo a formação do mcDNA e do mP. Simultaneamente, a endonuclease Scel-I é ativada e degrada o mP e resíduos de PP (adaptado de [76]).

De modo a obter a máxima produtividade devem ser considerados alguns parâmetros na etapa de produção, como a temperatura, a concentração de indutor e o tempo de indução [76]. A temperatura pode desencadear respostas de stress intracelular e afetar a taxa de replicação [57]. Assim, Gaspar e seus colaboradores realizaram uma otimização da produção do mcDNA e

concluíram que o aumento da temperatura para 42 °C, durante o crescimento bacteriano, promove a obtenção de um melhor rendimento de mcDNA [76]. Nesse trabalho foi também verificado que a percentagem de indutor utilizada tem um papel crucial na síntese de mcDNA, sendo que atualmente são várias as concentrações usadas pelos investigadores, nomeadamente 0,01%, 0,1% [76] e 2% [45] de L-arabinose. Por outro lado, os autores demonstraram que o rendimento do mcDNA e a quantidade de contaminantes varia ao longo do processo de recombinação [76]. Os meios de cultura também têm influência no rendimento de mcDNA, verificando-se que a eficiência de recombinação é superior nos meios enriquecidos [57].

1.3.2 Vantagens e limitações do mcDNA na terapia génica

Nos últimos anos, o interesse no mcDNA tem aumentado devido às características benéficas que lhe estão inerentes, tornando-se o vetor da “nova geração” promissor para fins terapêuticos [18,30,63]. Tal como observado na figura 7, o mcDNA é isento de todos os elementos da sequência bacteriana, consistindo exclusivamente no gene terapêutico [41,49,57]. Isto permite melhorar a biocompatibilidade e eficácia comparativamente ao pDNA [3,41,53]. Para além disso, o facto destes novos vetores serem moléculas de DNA mais pequenas torna-os mais baratos, possibilita uma maior estabilidade física [27,41] e aumenta a biodisponibilidade extra e intracelular [26,66,75,78], permitindo consequentemente melhorar a eficiência de transfecção [29, 45, 61, 119].

Por outro lado, devido à ausência dos motivos CpG o gene será expresso ao longo de várias semanas [87], pois não ocorre a formação de heterocromatina e reduz-se a morte das células transfetadas [45,63,84,88], ou seja a expressão do gene terapêutico é mais prolongada e eficiente [37,38,60,85]. A eliminação da marca de seleção e da origem de seleção intensifica a imunocompatibilidade e reduz o risco de propagação de genes resistentes a antibióticos [26]. Uma outra vantagem reside na obtenção de níveis mais elevados na produção de proteínas terapêuticas, como também na sua duração e imunogenicidade [38,45,60,76].

Têm-se realizado vários estudos que demonstram as vantagens inerentes à utilização deste vetor, nomeadamente ao nível do músculo-esquelético e do fígado do rato [28,49,53]. Todavia, esta abordagem tem como limitação o facto do processo de recombinação não ser totalmente eficiente e deste plasmídeo ser pouco imunogénico [9,30,59]. Por outro lado, já estão a ser realizados estudos que permitem superar os fatores ambientais a que está sujeito após entrada celular, e que promovem uma melhoria na transfecção [85]. Um resumo das vantagens e desvantagens do mcDNA estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Vantagens e desvantagens do mcDNA (adaptado de [9,26]).

<u>Vantagens do mcDNA</u>	<u>Desvantagens do mcDNA</u>
Melhora a compatibilidade biológica e imunológica	Recombinação intramolecular insuficiente
Melhora a biodisponibilidade	Falta de uma eficiente tecnologia de purificação
Diminui o risco de inserção genotóxica e de morte celular, da célula hospedeira	
Reduz o potencial de ativação de proto-oncogenes e a desativação do gene supressor de tumor	
Minimiza o silenciamento de transgene	
Permite eficiências de transfecção mais elevadas	

Para futura aplicação terapêutica será crucial otimizar-se o seu processo de produção, de forma a conseguir-se produzir quantidades adequadas do mcDNA e minimizar os custos associados [9,59,76]. Isto porque, a produção representa um procedimento trabalhoso e intensivo, com rendimentos baixos e elevadas contaminações [41,88]. Por outro lado, é necessário proceder-se à purificação desta molécula de DNA, de forma a obedecer às normas impostas pelas autoridades reguladoras [78,88].

1.3.3 Experiências de purificação do mcDNA

Muitos têm sido os esforços por parte dos investigadores na tentativa de purificar o mcDNA. Por exemplo, Chen desenvolveu um método que permitia degradar o mP e o PP, através da co-expressão de uma enzima de restrição. Porém, esta estratégia não foi bem-sucedida, pois continuavam presentes vestígios destes contaminantes, além dos custos serem elevados [59]. Darquet e colaboradores procederam à aplicação de gradientes de densidade utilizando o brometo de etídio e o cloreto de céσιο que não são concebíveis no contexto clínico, pois são reagentes tóxicos [29,61,78]. Isto é, para que o produto final possa ser administrado aos seres humanos e aos animais é crucial produzi-lo tendo em consideração as boas práticas de produção, descritas pela FDA [22], e como tal enzimas de origem animal e solventes tóxicos devem ser evitados [20].

Assim, apenas os métodos cromatográficos serão adequados e aceitáveis de forma a obter-se esta biomolécula pura e com aplicabilidade clínica [9]. Têm sido vários os esforços realizados na investigação para que seja criado um suporte cromatográfico ideal, que promova uma purificação adequada do mcDNA, cumprindo com os critérios exigidos pelas entidades

reguladoras. Neste âmbito, já realizaram-se ensaios com base na cromatografia de afinidade, contudo esta técnica depende de um processo de recombinação altamente eficiente [9].

Tendo em conta o descrito, será essencial desenvolver-se uma tecnologia de purificação eficiente, uma problemática que mantém-se até aos dias de hoje sem resolução e que o presente trabalho tentou elaborar.

CAPÍTULO 2 - Materiais e Métodos

2.1 Materiais

A amplificação do plasmídeo parental (PP) foi realizada utilizando a estirpe de *E. coli* ZYCY10P3S2T modificada geneticamente com o gene de resistência à canamicina (pMC). O vetor pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40 poliA de 7,06 kpb contém a origem de replicação de pUC19 e os locais de reconhecimento da recombinase. A estirpe de *E. coli* e o vetor usado na produção de mcDNA foram obtidos em System Biosciences.

Para a realização de lises alcalinas e recuperação do mcDNA utilizou-se o kit Qiagen Plasmid Maxi, da Qiagen. Todas as soluções utilizadas durante o protocolo experimental foram preparadas com água desionizada de grau ultra-pura, purificada com o sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, EUA). Os tampões de ligação e eluição usados no processo cromatográfico foram filtrados, através de membranas com um tamanho de poro de 0,2 μm (Schleicher Schuell, Dassel, Alemanha), e de seguida desgaseificados por ultra-som. Para as experiências cromatográficas, a coluna monolítica CIM DEAE-1, de 1,0 mL, que apresenta na sua composição química um fraco permutador de aniões foi cedida pela BIA Separations (Ajdovscina, Eslovénia).

2.2. Métodos

2.2.1 Condições de crescimento bacteriano e amplificação do PP

A amplificação do PP foi promovida por fermentação da estirpe *E.coli* ZYCY10P3S2T. O crescimento bacteriano realizou-se em erlenmeyer de um litro, contendo 250 mL de meio TB (24 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de triptona; 4 mL/L de glicerol; 0,017 M de KH_2PO_4 ; 0,072 M de K_2HPO_4 , a pH 7,0), a uma temperatura de 42 °C e com agitação constante de 250 rpm. O meio foi suplementado com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina e o crescimento foi interrompido na fase log tardia ($\text{DO}_{600} \sim 7$).

2.2.2 Síntese de mcDNA

A biossíntese do mcDNA, a partir do PP, foi realizada através da adição de uma mistura indutora contendo 250 mL de meio LB, 10 mL de NaOH 1,0 M e L-arabinose estéril (20% w/v) para uma concentração final de 0,01%. Esta mistura foi adicionada às culturas bacterianas, de forma a induzir o processo de recombinação, por um período de 3 horas, a 32 °C e com agitação constante de 250 rpm. Posteriormente, realizou-se a recuperação celular por

centrifugação a 4500 g, durante 10 min e a 4 °C. Por fim, os pellets de células obtidos foram guardados a -20 °C.

2.2.3 Recuperação do mcDNA

2.2.3.1 Lise alcalina utilizando o kit da Qiagen

O mcDNA e o PP residual foram recuperados usando o kit Plasmid Maxi da Qiagen, segundo as instruções do fabricante, mas com ligeiras modificações. Inicialmente, promoveu-se a lise celular e depois procedeu-se à pré-purificação. Ou seja, ressuspendeu-se o pellet bacteriano em 20 mL de tampão I (50 mM de Tris-HCl, a pH 8,0; 10 mM de EDTA; 100 µg/mL RNase A). Depois, promoveu-se a lise com a adição de 20 mL de tampão II (200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)) e incubou-se à temperatura ambiente, durante 5 minutos. De seguida, adicionou-se 20 mL de tampão III (3,0 M de acetato de potássio, a pH 5,5) e incubou-se no gelo, durante 20 minutos. Posteriormente, a ligação do mcDNA e de PP residual à coluna de troca aniónica foi promovida pela utilização de soluções tampão com baixo teor de sal e baixo pH. Depois, para a eliminação de RNA, de proteínas e de impurezas de baixo peso molecular utilizou-se um tampão com 0,80 M de NaCl, enquanto que para a eluição do DNA optou-se por um tampão de alto teor salino (1,75 M de NaCl). Posteriormente, concentrou-se a amostra através de precipitação com isopropanol. Por fim, a amostra obtida que contém ainda mcDNA e PP foi utilizada nos estudos cromatográficos para purificação do mcDNA.

2.2.3.2 Lise alcalina para a obtenção de uma amostra complexa

A fim de obter-se uma amostra de lisado complexa, para utilizar-se nos processos cromatográficos, realizou-se uma lise alcalina modificada, conforme descrito por Diogo e colaboradores em 2000 [90]. Assim, ressuspendeu-se o pellet bacteriano em 20 mL de solução I (50 mM glucose; 25 mM de Tris-HCl; 10 mM de EDTA, a pH 8,0). De seguida, efetuou-se a lise alcalina com a adição de 20 mL de solução II (200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)) e incubou-se à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Depois, para neutralizar a solução II, adicionou-se 20 mL de solução III (3,0 M de acetato de potássio, a pH 5,0) e incubou-se no gelo, durante 20 min. Para a eliminação de detritos celulares, gDNA e proteínas, centrifugou-se duas vezes a 20 000 g, durante 30 min, a 4 °C, utilizando a centrífuga Allegra™ 25R (Beckman Coulter, Miami, FL, EUA). A concentração e eliminação de algumas impurezas foram executadas de acordo com um método previamente publicado, mas com ligeiras modificações [90]. Resumidamente, procedeu-se à precipitação dos ácidos nucleicos presentes no sobrenadante, através da adição de 0,7 volumes de isopropanol. Depois, incubou-se 30 min em gelo e, de seguida, recuperou-se o precipitado por centrifugação a 16 000 g, durante 30 min, a 4 °C. Posteriormente, redissolveu-se o precipitado em 2,0 mL de 10 mM de Tris-HCl, a pH 8,0.

Seguidamente, foi realizada uma precipitação com sulfato de amónio para eliminação de algumas proteínas e de RNA, até uma concentração final de 2,0 M e incubou-se no gelo, durante 15 min. Por fim, as impurezas foram removidas por centrifugação a 16 000 g, durante 20 min, a 4°C, tendo-se assim obtido uma amostra representativa para ser utilizada nos métodos cromatográficos.

2.2.3.3 Linearização da amostra de mcDNA

Com a finalidade de comprovar a inexistência de gDNA, após a lise alcalina com o kit da Qiagen, efetuou-se uma linearização da amostra de mcDNA. Para tal, utilizou-se 1 µg de amostra e adicionou-se 1 µL da enzima BamHI, 2 µL de tampão 10x e completou-se até um volume de 20 µL com água esterilizada. De seguida, realizou-se uma incubação a 37 °C, durante uma hora. Após completar-se o tempo de reação realizou-se uma eletroforese em gel de agarose, de acordo com o descrito no tópico 2.2.4.2.

2.2.4 Purificação do mcDNA

2.2.4.1 Cromatografia de troca aniónica

As experiências cromatográficas foram realizadas num sistema AKTA Purifier (GE Healthcare Biosciences Uppsala, Suécia) que consiste numa unidade de separação compacta e num computador com software de UNICORN™ 5.11. Utilizou-se uma coluna monolítica CIM DEAE-1, fornecida pela BIA Separations (Ajdovscina, Slovenia), que apresenta na sua composição química um fraco permutador de aniões e que tem um volume do leito de 1,0 mL. Para a purificação do mcDNA, a coluna foi equilibrada com 710 mM de NaCl, em tampão de 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), a um caudal de 1,0 mL/min. Posteriormente, a amostra que resultou da lise alcalina modificada foi injetada na coluna utilizando um loop de 100 µL, nas mesmas condições de fluxo. As espécies que não ligaram à coluna foram eluídas e de seguida promoveu-se um aumento da força iónica, de modo a eluir as diferentes espécies que ficaram ligadas na coluna. Assim, procedeu-se a um aumento gradual da concentração de NaCl até 750 mM, durante 15 minutos. Por último, realizou-se um passo a 1,0 M NaCl para eluir alguma espécie mais retida na coluna. As frações foram recuperadas de acordo com os cromatogramas obtidos, e de seguida procedeu-se à precipitação dos ácidos nucleicos, pela adição de 1,0 volume de isopropanol. Após 10 minutos em gelo recuperou-se o precipitado por centrifugação (Hettich Mikro 200R) a 16 000g, durante 10 minutos e ressuspenderam-se os pellets em 50 µL de 10 mM de Tris-HCl, a pH 8,0. Após o processo de concentração das amostras estas foram utilizadas para a análise eletroforética e para a quantificação de impurezas. Todas as experiências cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente,

sendo que a absorvância foi continuamente monitorizada a 260 nm. No final do processo cromatográfico a coluna e o sistema AKTA foram limpos com água MiliQ.

2.2.4.2 Eletroforese em gel de agarose

As frações que foram recuperadas no final de cada ensaio cromatográfico foram analisadas por eletroforese horizontal utilizando um gel de agarose a 0,8% (Hoefer, Holliston, MA, EUA), e com um comprimento de 15 cm. Para proceder-se à visualização do gel usou-se 0,016 µL/mL de Greensafe premium (NZYTech, Lda. - Genes and Enzymes, Lisbon, Portugal). A eletroforese foi realizada a 120 V, durante 30 minutos, num tampão TAE (40 mM Tris-base, 20 mM ácido acético e 1,0 mM EDTA, pH 8,0). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta (UV), num FireReader (Uvitec Cambridge, Cambridge, Reino Unido).

2.2.4.3 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas, presentes nas frações recolhidas durante processo cromatográfico, foi avaliada através de um kit de ensaio proteico micro-BCA (ácido bicinonínico), adquirido à Pierce (Rockford, USA). O ensaio foi realizado em microplaca, à qual adicionaram-se 200 µL de reagente BCA e 25 µL de cada amostra. De seguida, procedeu-se a uma incubação de 30 minutos, a 37 °C, e efetuaram-se as leituras de absorvância, a 595 nm, num leitor de microplacas. A curva de calibração foi construída usando como proteína padrão a Albumina de Soro Bovino (BSA), num intervalo de concentrações de 20 - 2000 µg/mL.

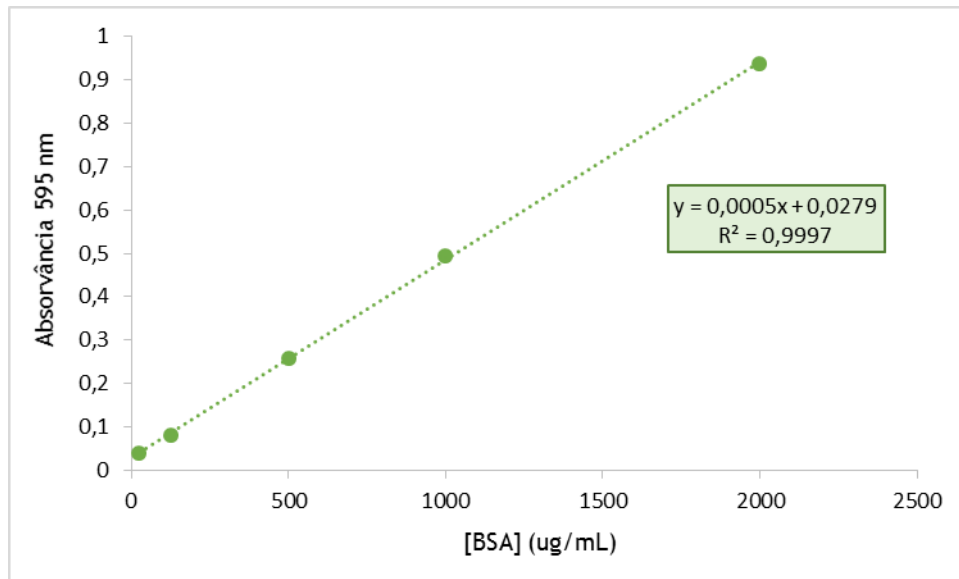


Figura 8. Curva de referência para os padrões de BSA, utilizada para quantificar-se o teor de proteínas presente nas amostras purificadas.

2.2.4.4 Quantificação de DNA genómico

Para determinar-se a quantidade de DNA genómico, presente em cada fração recolhida durante processo cromatográfico, efetuou-se uma reação em cadeia pela polimerase (PCR), em tempo real, num sistema de deteção PCR Real-Time Multicolor (BioRad).

Porém, antes de proceder-se à quantificação de gDNA teve-se de fazer a sua extração, a partir do hospedeiro *E.coli* não transformada, a fim de avaliar-se se os primers disponíveis amplificavam o fragmento do gene do rRNA 16S. Assim, primeiramente procedeu-se ao crescimento bacteriano e de seguida à recuperação celular por centrifugação a 4500g, durante 10 min e a 4 °C. Posteriormente, efetuou-se a recuperação do gDNA usando o kit Wizard de purificação de DNA genómico, da Promega.

Como tal, só depois do procedimento anterior e confirmação de resultados é que realizou-se a quantificação de gDNA. Assim, os primers utilizados para amplificar o fragmento de 181 pares de bases do gene do rRNA 16S foram: sense (5'-ACACGGTCCAGAACTCCTACG-3') e antisense (5'-CCGGTGCTTCTTCTGCGGTAACGTCA-3'). Posteriormente, as regiões amplificadas foram quantificadas por alteração na fluorescência do DNA ligado ao corante Syber Green I. A fim de obter-se a concentração de DNA genómico construiu-se uma curva de calibração, através de diluições em série da amostra de DNA genómico da *E. coli*, num intervalo de concentrações de 0,005 a 50 ng/µL.

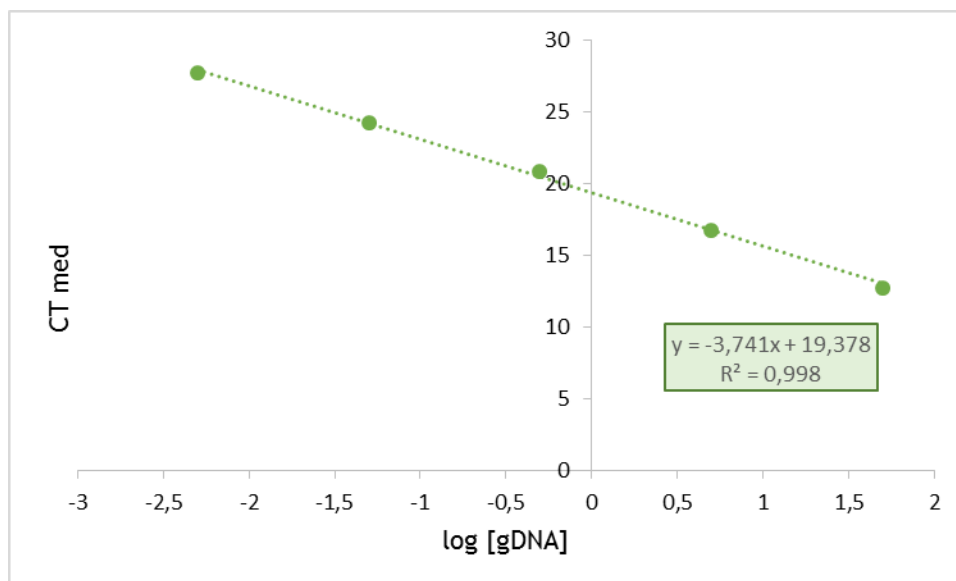


Figura 9. Curva de referência para os padrões de gDNA, utilizada para quantificar-se o teor de DNA genómico presente nas amostras purificadas.

2.2.4.5 Quantificação de endotoxinas

A determinação de endotoxinas foi realizada utilizando um kit de lisado ToxinSensor™ Chromogenic *Limulus* amoebocyte, adquirido à GenScript (USA, Inc.). Para tal, foi estabelecida uma curva de calibração, com base numa solução stock 10 EU/mL, fornecida no kit, num intervalo de concentrações de 0,005 - 0,1 EU/mL. Todo o procedimento foi realizado numa câmara de fluxo laminar, a fim de minimizar possíveis contaminações e todas as soluções e materiais usados devem ser livre de endotoxinas. As diluições das amostras da curva de calibração e das amostras recolhidas durante processo cromatográfico para a análise foram realizadas com água não-pirogénica, que por sua vez foi também usada como branco.

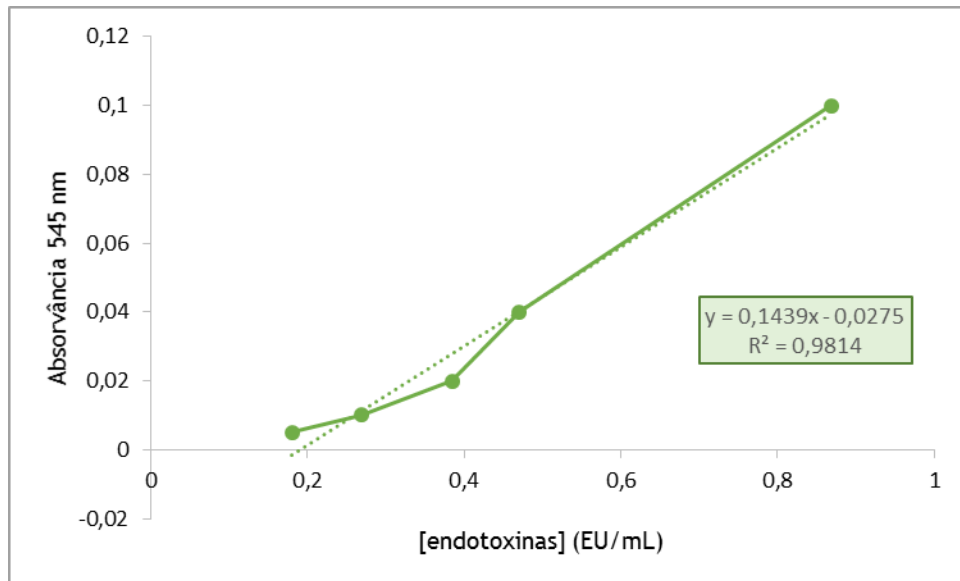


Figura 10. Curva de referência para os padrões de endotoxinas, utilizada para quantificar-se o teor de endotoxinas presente nas amostras purificadas.

CAPÍTULO 3- Resultados e Discussão

Considerando a existência de numerosas patologias que continuam sem resolução clínica, e que conseqüentemente provocam a morte a milhares de pessoas, vários têm sido os estudos de desenvolvimento de novas estratégias que apostam numa terapêutica à base de DNA. Estes estudos têm sido baseados no uso de pDNA, mas apesar das inúmeras vantagens que lhe estão inerentes ainda persistem alguns obstáculos que limitam a sua possível aplicabilidade clínica.

Como tal, alguns investigadores centram-se no estudo do mcDNA, que é considerado o vetor não viral da “nova geração”, pois supera a maior parte das desvantagens inerentes ao pDNA. Sendo esta abordagem relativamente nova são vários os pontos que terão de ser otimizados, nomeadamente ao nível da produção e purificação desta biomolécula.

Assim, no presente trabalho procedeu-se à otimização do processo de produção, na tentativa de melhorar o rendimento de mcDNA, pois tem uma influência direta no processo “Downstream”. Depois, utilizou-se uma coluna de troca aniônica para a purificação desta biomolécula e efetuou-se uma caracterização da amostra recolhida, com a finalidade de averiguar-se se a amostra cumpre os critérios definidos pelas entidades reguladoras, para posterior aplicação terapêutica.

3.1 Biosíntese do mcDNA

Atendendo a que os passos iniciais que constituem a tecnologia do DNA recombinante são determinantes no rendimento de produção do vetor é crucial a sua otimização. Assim, há que ter em consideração qual o hospedeiro mais eficiente em termos de benefícios e custos. Segundo a literatura, a *E. coli* é o hospedeiro que reúne as melhores características ao promover uma rápida amplificação e ao ter capacidade de produzir elevadas quantidades do vetor, mantendo a sua integridade [25,29]. Outro fator a ponderar são as condições do meio de crescimento que interferem com a estabilidade do plasmídeo e com a fisiologia da célula [12,20]. Portanto, a *E. coli* foi o hospedeiro selecionado para a realização deste trabalho e, tendo como finalidade a obtenção de uma elevada densidade celular ($DO \leq 7$), o plasmídeo utilizado foi amplificado num meio TB, a 42 °C, durante um período de cerca de 8 horas (Figura 11). Foi utilizada a temperatura de 42 °C durante o processo de amplificação, pois segundo a literatura esta temperatura permite a obtenção de melhores rendimentos [76].

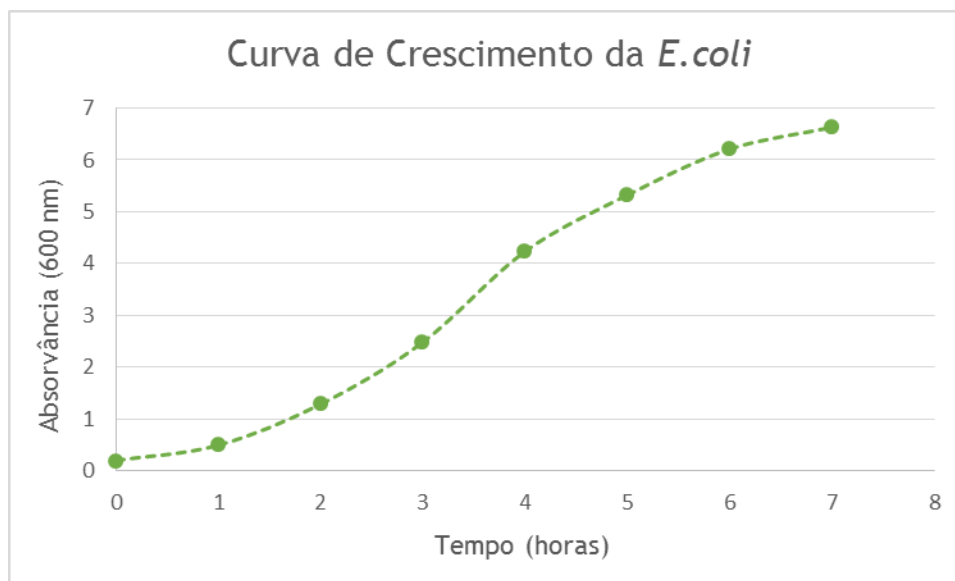


Figura 11. Curva de crescimento da *E. coli* transformada com o plasmídeo parental.

Posteriormente, e tendo em consideração que o objetivo era produzir o mcDNA, foi necessário realizar um processo de indução. Após amplificação do PP promoveu-se a recombinação intramolecular que resulta na síntese do mcDNA e do mP [51,57,59]. Para a realização deste procedimento teve-se como base o descrito por Gaspar e seus colaboradores, que estudaram duas estratégias de indução e duas percentagens de L-arabinose, e avaliaram o teor de mcDNA e de contaminantes (mP e resíduos de PP) ao longo de 5 h [76]. Assim, optou-se por testar as condições já descritas na tentativa de melhorar o rendimento já conseguido pelo grupo.

Inicialmente, e tendo como principal objetivo a obtenção máxima de mcDNA independentemente do teor de contaminantes presentes decidiu-se utilizar 0,1% de L-arabinose, aplicando a estratégia sem mistura indutora (MI). Especificando, esta primeira estratégia consistiu apenas na utilização do indutor. Assim, após a amplificação do PP, procedeu-se à adição de L-arabinose (0,1%) e de seguida promoveu-se a recombinação intramolecular, durante 4 horas, a 32 °C. A escolha de 4 horas de indução baseou-se no que está descrito na literatura, que indica que para uma percentagem de 0,1% de indutor é o tempo necessário para a obtenção de maior concentração de mcDNA [76].

Posteriormente, efetuou-se a recuperação da amostra de mcDNA e procedeu-se à otimização deste processo. O procedimento de otimização da recuperação está descrito no tópico 3.2.1. tendo sido utilizado exclusivamente os pellets obtidos pela estratégia de indução descrita anteriormente. Assim, todos os resultados de concentração do mcDNA que vão ser apresentados posteriormente foram obtidos utilizando já o processo de lise alcalina otimizado.

Atendendo a que o rendimento obtido com a estratégia de indução sem mistura indutora era insatisfatório (Tabela 4) optou-se por testar a mesma percentagem de indutor mas adicionando uma mistura indutora, constituída por 25 g/L de meio LB e 1,0 M de NaOH. Para tal, a um volume de 125 mL de meio TB, após a amplificação do PP, adicionou-se 125 mL da mistura indutora. Depois acrescentou-se a L-arabinose e promoveu-se assim a síntese do mcDNA, colocando num agitador orbital, a 32 °C, durante 4 horas. Ambas as estratégias descritas estão esquematizadas na figura 12.

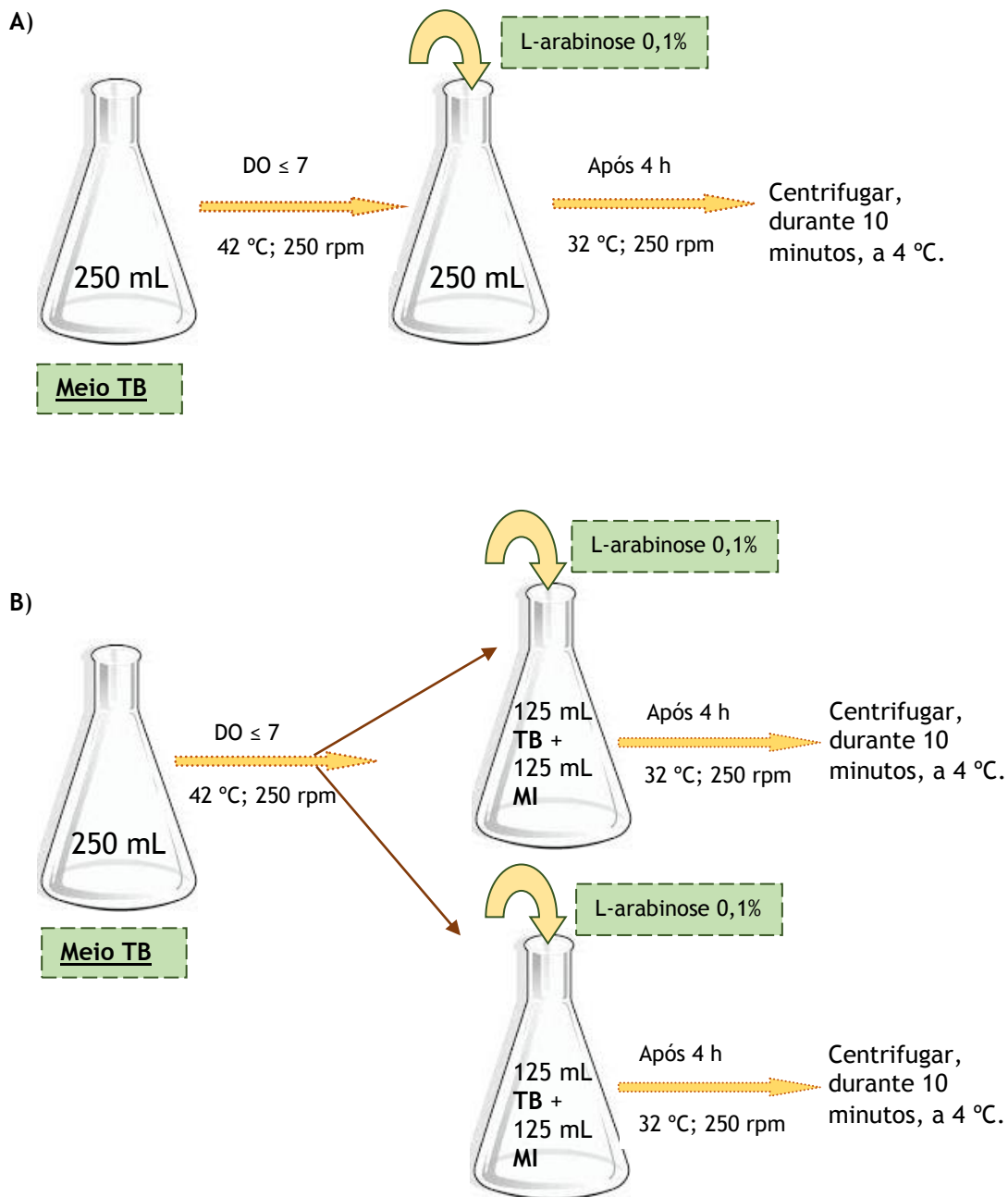


Figura 12. Esquemática das duas estratégias de indução utilizadas na produção de mcDNA. **A)** Indução por adição de 0,1% de L-arabinose a 250 mL de meio TB, após amplificação bacteriana do PP. **B)** Indução por adição de 0,1% de L-arabinose e uma mistura indutora, constituída por meio LB (25 g/L) e por NaOH (1,0 M).

Observou-se que a utilização de mistura indutora foi vantajosa para a obtenção de melhores rendimentos de mcDNA, tal como demonstrado na tabela 4 e ilustrado na figura 13.

Tabela 4. Rendimento de produção do mcDNA correspondente às duas estratégias de indução, utilizando 0,1% de L-arabinose.

Percentagem de indutor	[mcDNA] utilizando estratégia sem mistura indutora	[mcDNA] utilizando estratégia com mistura indutora
0,1%	138 µg/mL	296 µg/mL

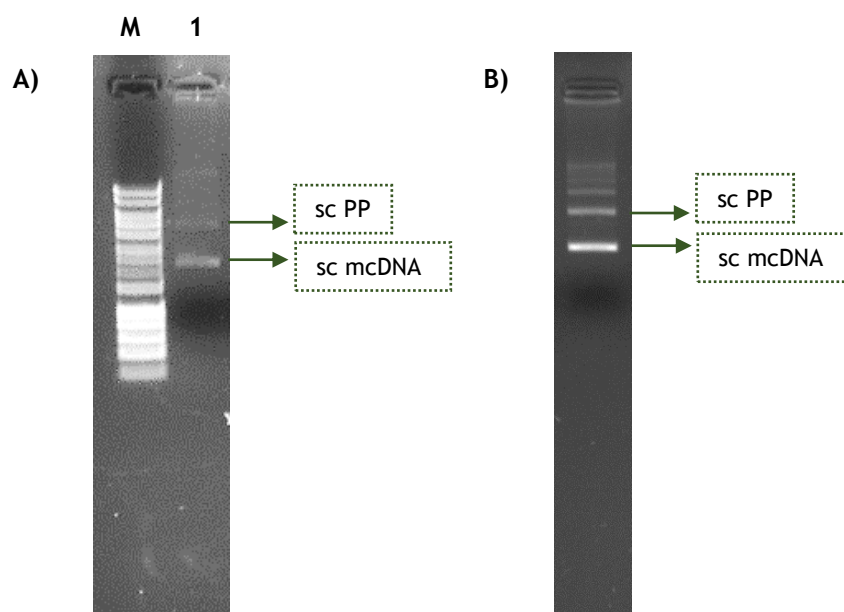


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose das amostras de mcDNA. A) M: Marcador; Linha 1: Amostra de mcDNA produzido através da estratégia sem mistura indutora. B) Amostra de mcDNA produzido através da estratégia com mistura indutora.

Com a finalidade de tentar-se melhorar o rendimento obtido, otimizando a produção do mcDNA, que tem um impacto significativo no processo “Downstream” foram ainda testadas outras condições de indução. Na literatura são várias as percentagens de indutor recomendadas, como por exemplo 0,01% [76] e 2% [45], e tal como já referido anteriormente o indutor desempenha um papel fundamental na produção do mcDNA, pois é o que induz o promotor BAD.phiC31 a expressar a recombinase serina e o que ativa a endonuclease Scel-I [78,87]. Assim, neste trabalho foram também testadas mais duas concentrações de L-arabinose: 0,01% e 0,2%, a fim de experimentar-se uma concentração mais elevada e outra mais reduzida comparativamente à já testada anteriormente. Com esta avaliação podia-se verificar se a concentração inicialmente testada era insuficiente para promover uma recombinação eficiente ou se seria excessiva podendo desempenhar alguma toxicidade celular. Experimentalmente testaram-se estas duas condições utilizando-se para ambas as percentagens a estratégia de indução com mistura indutora, uma vez que tinha demonstrado ser mais vantajosa.

Verificou-se que quanto maior é a percentagem de L-arabinose mais baixo é o rendimento obtido, o que poderá ser devido a uma possível toxicidade celular que o indutor desempenhe e/ou devido a uma saturação dos recetores celulares. Assim, e tal como apresentado na tabela 5, a melhor percentagem de indutor a utilizar de modo a maximizar o rendimento do mcDNA é de 0,01%, sendo de realçar que para esta percentagem de indutor também obtém-se menor quantidade de contaminantes, nomeadamente de PP, tal como ilustrado na figura 14.

Tabela 5. Avaliação da produção de mcDNA, usando diferentes percentagens de indutor e utilizando a mistura indutora, como estratégia de indução.

Percentagem de indutor	[mcDNA] utilizando estratégia com mistura indutora
0,01%	438 µg/mL
0,1%	296 µg/mL
0,2%	268 µg/mL

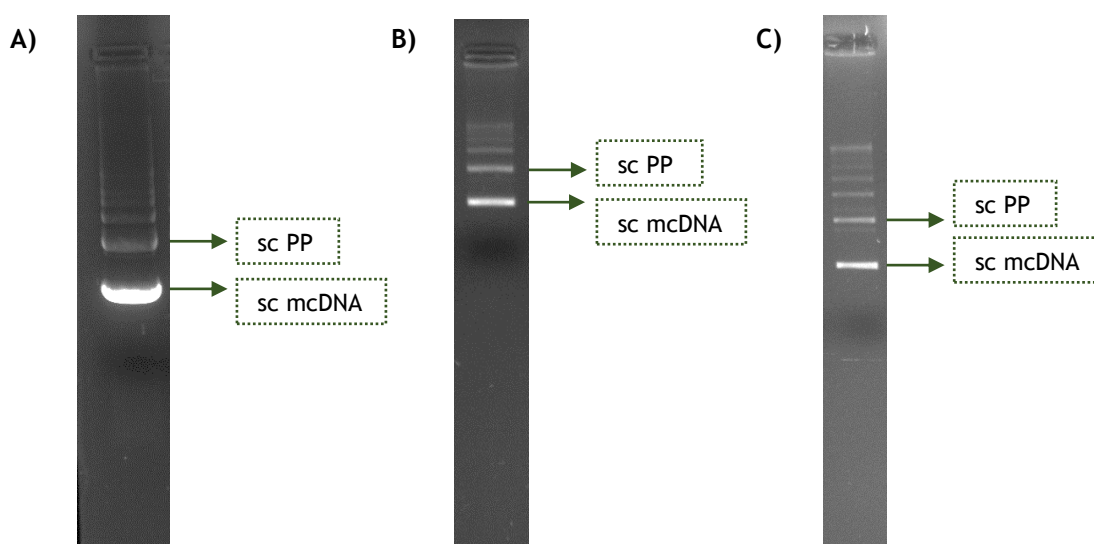


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose das amostras de mcDNA produzido através de indução com: A) 0,01% de L-arabinose; B) 0,1% de L-arabinose; C) 0,2% de L-arabinose.

Como o meio de crescimento influencia a fisiologia da estirpe e consequentemente interfere com o rendimento do vetor [29] este parâmetro foi também avaliado, na tentativa de otimizar a produção do mcDNA. Tal como descrito anteriormente, o meio utilizado para promover a amplificação bacteriana foi o meio TB, por ser um meio complexo e assim permitir melhorar a produtividade [29,53].

No entanto, para a produção do mcDNA era utilizada uma mistura indutora constituída por meio LB e NaOH. A fim de avaliar-se se o meio utilizado na mistura indutora interfere com o rendimento obtido decidiu-se substituir o meio LB pelo meio TB. Para esta experiência, e tendo em consideração os resultados obtidos anteriormente, utilizou-se 0,01% de L-arabinose

e aplicou-se a estratégia com mistura indutora. O resultado obtido revela que a utilização de um meio TB não promoveu uma melhoria na produção do mcDNA, tal como é indicado na tabela 6.

Tabela 6. Demonstração do rendimento do mcDNA quando usado o meio TB ou meio LB na mistura indutora.

Porcentagem de indutor	[mcDNA], utilizando meio LB na mistura indutora	[mcDNA], utilizando meio TB na mistura indutora
0,01%	438 µg/mL	241 µg/mL

Assim, e tendo em conta os resultados obtidos, a utilização de uma mistura indutora constituída por meio LB e NaOH e suplementada com 0,01% de L-arabinose revela ser a melhor estratégia para a produção de mcDNA. Apesar do processo de produção ser mais complexo, comparativamente à produção do pDNA, com estas otimizações foi possível produzir o mcDNA de forma mais rápida e ter rendimentos similares aos estabelecidos para o pDNA.

3.2 Recuperação do mcDNA

3.2.1 Lise alcalina e pré-purificação utilizando o kit da Qiagen

Após a síntese do mcDNA procedeu-se à sua recuperação, a fim de confirmar-se a produção do vetor e para obter-se amostras representativas a utilizar nas experiências cromatográficas. Inicialmente, e com o objetivo de obterem-se amostras mais simples, aplicou-se o protocolo do kit da Qiagen. Atendendo a que ainda não se conheciam as condições ideais a utilizar para ter a máxima recuperação de mcDNA efetuou-se a otimização do protocolo. Todas as experiências de otimização do procedimento de recuperação do mcDNA foram realizadas utilizando pellets que resultaram de um processo de indução sem mistura indutora usando 0,1% de L-arabinose, uma vez que nesta fase do trabalho a produção não estava ainda otimizada. Durante estes procedimentos de otimização foram recolhidas frações, aquando da passagem do tampão de lavagem e do tampão de eluição, para verificar-se se todo o mcDNA era recuperado ou estaria a eluir em passos prévios.

As colunas utilizadas neste procedimento são de troca iónica contendo aminas carregadas positivamente. A amostra sendo constituída por DNA que contém grupos fosfato, carregados negativamente, pode interagir com as aminas, carregadas positivamente. Logo, os tampões de lavagem e eluição contêm na sua constituição um sal caotrópico (NaCl) o que permite a competição com as espécies ligadas, e conseqüentemente possibilita a sua eluição.

O protocolo do kit da Qiagen propõe a utilização de 1,00 M e 1,25 M de NaCl no tampão de lavagem e no tampão de eluição, respetivamente. Porém, como o protocolo já tinha sido ajustado no grupo de investigação, numa primeira fase utilizaram-se as concentrações de NaCl para o tampão de lavagem e de eluição de 0,50 M e 1,25 M, respetivamente. Com a finalidade de averiguar-se se 1,25 M de NaCl seria suficiente para promover a eluição completa do mcDNA também testou-se 1,75 M de NaCl, no tampão de eluição. Ou seja, no passo de eluição efetuaram-se duas eluições consecutivas com tampões de diferentes concentrações de sal. Tal como observado na figura 15 (A), 1,25 M de NaCl não foi suficiente para eluir todo o vetor, pois quando promoveu-se a passagem do tampão de eluição a 1,75 M de sal ainda houve eluição do mcDNA. Por outro lado, observa-se que 0,50 M de NaCl no tampão de lavagem não é suficiente para eluir todo o RNA.

Estas diferenças resultam do facto de serem utilizados vetores de dimensões e composição diferente, que podem influenciar o padrão de retenção e eluição, e por isso torna-se crucial ajustar as condições de acordo com o vetor usado.

Tendo em conta o resultado anterior, conclui-se que a concentração de sal adequada para utilizar no tampão de eluição é de 1,75 M de NaCl, pois é a que promove uma eluição e recuperação total do mcDNA. Por outro lado, foi também necessário aumentar a concentração de sal no tampão de lavagem de forma a permitir a eliminação total do RNA. Portanto, optou-se por usar 0,75 M de NaCl no tampão de lavagem, e o resultado obtido está representado na figura 15 (B), com a qual conclui-se que esta concentração de sal também não é suficiente para promover a completa eluição de RNA.

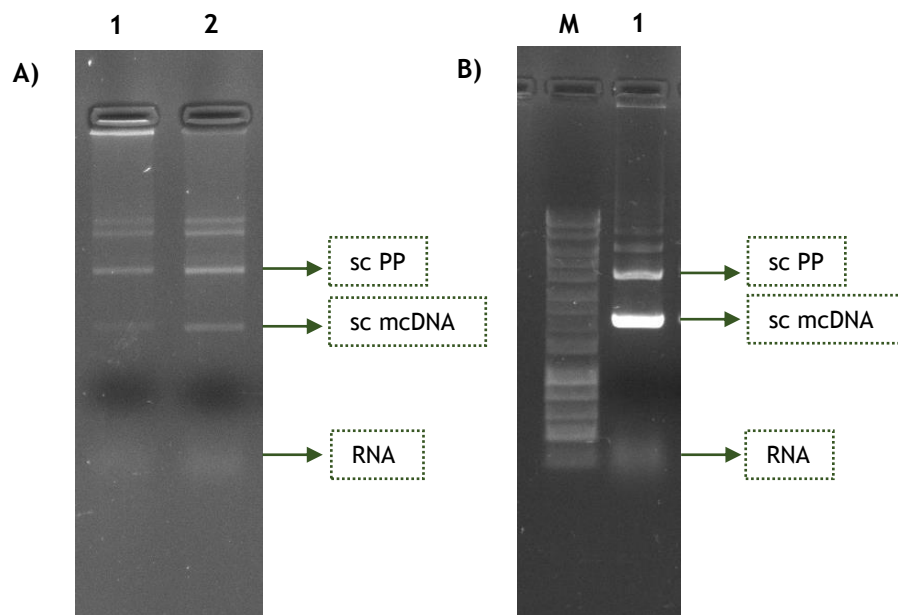


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose das amostras de mcDNA, após isolamento com o kit da Qiagen com ligeiras modificações. **A)** Linha 1: Fração recolhida durante a passagem do tampão de eluição a 1,75 M de NaCl; Linha 2: Fração recolhida durante a passagem do tampão de eluição a 1,25 M de NaCl. **B)** M: Marcador; Linha 1: Amostra de mcDNA recuperado na estratégia com 0,75 M e 1,75 M de NaCl, no tampão de lavagem e no tampão de eluição, respetivamente.

Atendendo aos resultados obtidos, procedeu-se à realização de novas modificações em relação à concentração de NaCl no tampão de lavagem. Assim, foram várias as concentrações testadas tendo-se iniciado com a concentração de sal indicada no protocolo da Qiagen, que é 1,00 M de NaCl.

Analisando a figura 16 podemos concluir que 1,00 M de sal no tampão de lavagem é excessivo, pois promove perdas do vetor durante a segunda lavagem, e consequentemente interfere com o rendimento obtido, que é demasiado baixo, tal como apresentado na tabela 7. A utilização de 0,90 M de NaCl também não foi vantajosa, pois os rendimentos obtidos foram muito baixos, apesar de não visualizarem-se perdas de mcDNA durante as lavagens. Esta discrepância de resultados pode justificar-se pelo facto das frações recolhidas não serem suficientes ou representativas do processo. Decidiu-se testar 0,85 M de NaCl que revelou ser eficiente na eliminação das impurezas, o que permitiu melhorar a recuperação do mcDNA. Porém, na tentativa de encontrar uma condição que permitisse obter um rendimento mais significativo do mcDNA, testou-se 0,80 M de NaCl (Figura 16). Já era conhecido que 0,75 M de sal não era suficiente para eliminar totalmente o RNA, e que 0,85 M permitia a eliminação total das impurezas. Assim, avaliou-se uma condição intermédia a fim de averiguar se promovia igualmente a eluição total do RNA, não comprometendo a recuperação de mcDNA. Desta forma, tentou-se atingir um equilíbrio entre a concentração final de mcDNA e o teor de impurezas. Tal como ilustrado na figura 16, esta percentagem de sal promove a eliminação do RNA, durante a primeira lavagem, e os rendimentos obtidos são satisfatórios (Tabela 7).

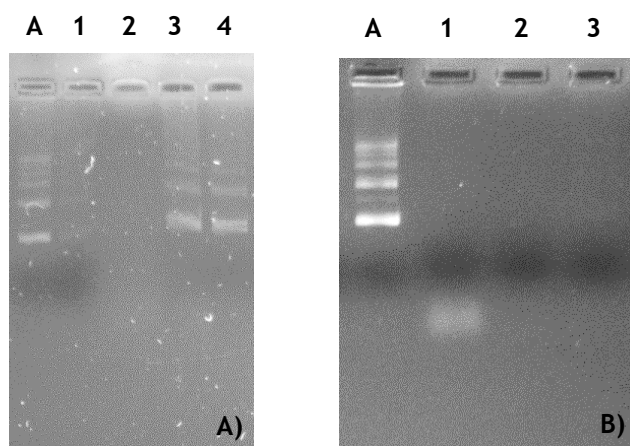


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose das amostras de mcDNA, após isolamento com o kit da Qiagen com ligeiras modificações. Em todas as experiências utilizou-se 1,75 M de NaCl no tampão de eluição. **A)** A: Amostra de mcDNA quando utilizado 1,00 M de NaCl no tampão de lavagem; Linha 1 e Linha 2: Fração durante a primeira lavagem; Linha 3: Fração durante a segunda lavagem; Linha 4: Fração durante a eluição. **B)** A: Amostra de mcDNA quando utilizado 0,80 M de NaCl no tampão de lavagem; Linha 1: Fração durante a primeira lavagem; Linha 2: Fração durante a segunda lavagem; Linha 3: Fração durante a eluição.

Tabela 7. Resultados da recuperação do mcDNA quando usadas diferentes concentrações de NaCl no tampão de lavagem, durante a aplicação do kit da Qiagen.

Concentração de NaCl, no tampão de lavagem	[mcDNA] final
1,00 M	18,00 µg/mL
0,90 M	26,00 µg/mL
0,85 M	84,00 µg/mL
0,80 M	138,0 µg/mL
0,75 M	169,0 µg/mL
0,50 M	99,00 µg/mL

Atendendo aos resultados, considerou-se que as melhores condições para a recuperação do mcDNA seriam a utilização de 0,80 M de NaCl no tampão de lavagem e 1,75 M de NaCl no tampão de eluição.

3.2.2 Lise alcalina para a obtenção de uma amostra complexa

Tal como descrito no tópico anterior, é essencial proceder à recuperação do mcDNA após a sua produção com a finalidade de preparar amostras representativas para utilizar nas experiências cromatográficas. Neste caso específico, o objetivo focou-se na preparação de amostras mais complexas, como as obtidas num lisado clarificado. Para a execução deste processo utilizaram-se pellets de células obtidos na fermentação realizada com 0,01% de indutor e com mistura indutora, isto é com a estratégia de produção já otimizada. Realizou-se uma lise alcalina modificada, conforme descrito por Diogo e seus colaboradores [90], e posteriormente procedeu-se à concentração da amostra e à redução do teor de impurezas de acordo com um método previamente publicado [90], mas com ligeiras modificações. Um dos passos importantes nesta abordagem é a precipitação com sulfato de amónio, que permite clarificar a amostra de DNA, removendo parcialmente o RNA e as proteínas. Como este procedimento não tinha ainda sido realizado para a recuperação de mcDNA considerou-se pertinente o estudo de várias concentrações de sal (para além de 2,5 M normalmente estabelecido no protocolo) de forma a otimizar o protocolo para esta biomolécula. De facto, os resultados indicaram que 2,5 M de sulfato de amónio era uma concentração excessiva, pois resultava na obtenção de um rendimento baixo (Tabela 8), que poderá ser justificado pela precipitação conjunta de mcDNA e contaminantes.

Atendendo ao resultado anterior, testaram-se concentrações de sulfato de amónio mais reduzidas, nomeadamente 1,5 M e 2,0 M de sal, repetindo também a concentração de 2,5 M. No final da incubação em gelo, que facilita a precipitação, recuperou-se o sobrenadante, mas também ressuspenderam-se os pellets com Tris-HCl a 10 mM (pH 8,0) a fim de apurar-se a

possível co-precipitação do mcDNA e concluir sobre a melhor concentração de sulfato de amônio a utilizar para recuperar o mcDNA, eliminando alguns contaminantes da amostra.

Tabela 8. Resultados do rendimento do lisado quando usadas diferentes concentrações de sulfato de amônio no passo da precipitação, durante a lise alcalina modificada.

Concentração de sulfato de amônio	[Lisado clarificado] final
1,5 M	4780 µg/mL
2,0 M	2950 µg/mL
2,5 M	299,0 µg/mL

Neste estudo verificou-se que utilizando 2,5 M de sulfato de amônio todo o RNA precipita e o teor de mcDNA é inferior ao recuperado no sobrenadante das restantes precipitações com concentrações de sal mais reduzidas (Figura 17 (A) - linha 3). Este resultado foi também comprovado pela quantificação da amostra (Tabela 8).

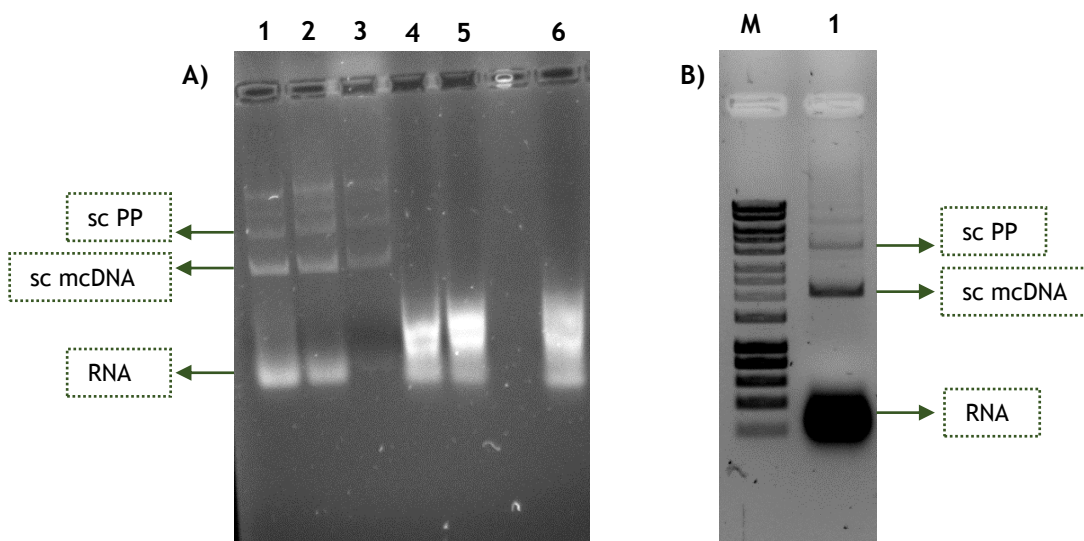


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose das amostras de lisados clarificados. **A)** Linha 1: Amostra de lisado obtida após precipitação com 1,5 M de sulfato de amônio; Linha 2: Amostra de lisado obtida após precipitação com 2,0 M de sulfato de amônio; Linha 3: Amostra de lisado obtida após precipitação com 2,5 M de sulfato de amônio; Linha 4: Ressuspensão do pellet com Tris-HCl, após precipitação com 1,5 M de sulfato de amônio; Linha 5: Ressuspensão do pellet com Tris-HCl, após precipitação com 2,0 M de sulfato de amônio; Linha 6: Ressuspensão do pellet com Tris-HCl, após precipitação com 2,5 M de sulfato de amônio. **B)** Eletroforese em gel de agarose das amostras de lisado clarificado após otimização da concentração de sulfato de amônio para 2,0 M, no passo de precipitação. M: Marcador; Linha 1: Amostra de lisado clarificado de mcDNA.

Atendendo a que o objetivo é obter uma amostra parcialmente complexa, isto é com presença de DNA e RNA para otimizar o processo de purificação, optou-se por selecionar 2,0 M

de sulfato de amônio como a concentração mais adequada para promover uma eficiente precipitação. A escolha de 2,0 M de sal, em relação a 1,5 M, residiu no facto de promover-se mais precipitação de RNA nesta condição.

3.2.3 Produção e Recuperação do PP

Para servir de controlo e para comparação de perfis cromatográficos e electroforéticos foi preparada sempre uma amostra de PP. Assim, o plasmídeo foi amplificado num meio TB, a 42 °C, durante um período de cerca de 8 horas. A sua recuperação foi realizada usando o kit da Qiagen e revelou-se que os melhores resultados de recuperação de PP eram conseguidos com a utilização da estratégia otimizada para o mcDNA (Figura 18), já descrita acima. O resultado revelou melhorias na recuperação ficando assim definidas as condições a utilizar, quando pretende-se obter uma amostra de PP sem presença de RNA (Tabela 9).

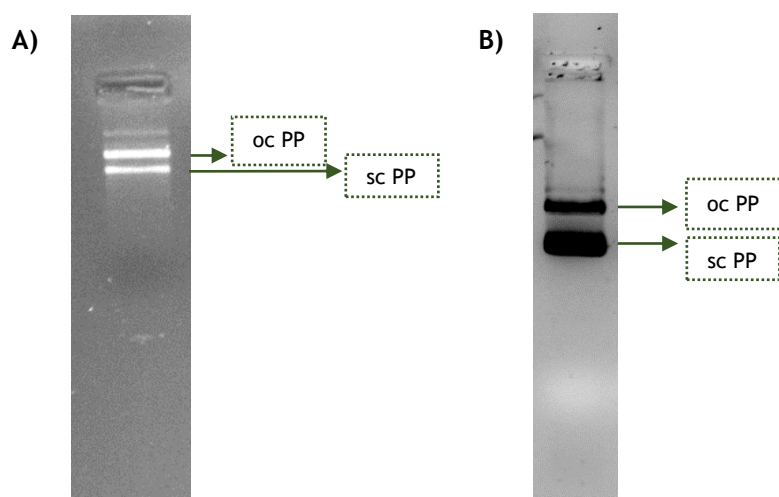


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose das amostras de PP recuperado com o kit da Qiagen. **A)** Amostra de PP que foi obtida quando utilizou-se 0,50 M e 1,25 de NaCl, no tampão de lavagem e no tampão de eluição, respetivamente (procedimento ajustado pelo grupo de investigação). **B)** Amostra de PP que foi obtida após a otimização do processo usando 0,80 M e 1,75 M de NaCl, no tampão de lavagem e no tampão de eluição, respetivamente.

Tabela 9. Resultados do rendimento de recuperação do PP quando usadas diferentes concentrações de sal, nos tampões de lavagem e de eluição, durante a purificação com o kit da Qiagen.

Concentração de NaCl, no tampão de lavagem/tampão de eluição	[PP] final
0,50 M/1,25 M	193 µg/mL
0,80 M/1,75 M	629 µg/mL

As condições utilizadas para a recuperação da amostra de lisado contendo PP, através da lise alcalina modificada, foram as mesmas já descritas como mais vantajosas para obtenção de lisado clarificado com mcDNA. Ou seja, procedeu-se à precipitação do RNA e das proteínas usando a concentração de 2,0 M de sulfato de amónio, tendo sido obtido um rendimento de 3150 µg/mL.

3.2.4 Linearização das amostras de mcDNA

Analisando a figura 19 observa-se a presença de diversas bandas correspondentes às isoformas do mcDNA e do PP, numa amostra purificado com o kit comercial. Porém, também há a presença de outras bandas que são difíceis de identificar imediatamente, e assim com a finalidade de despistar a presença de gDNA efetuou-se uma linearização da amostra de mcDNA. De acordo com a literatura, a BamHI é uma enzima de restrição que reconhece apenas uma sequência de nucleótidos (GGATCC) e que lineariza o mcDNA a 3881 pb [15]. Como tal, esta enzima foi a utilizada para confirmar-se a presença ou não de contaminantes.

A linearização foi realizada procedendo-se à incubação da amostra na presença da respetiva enzima de restrição a 37 °C, durante uma hora. Após este período de tempo analisou-se a amostra através de uma eletroforese em gel de agarose, e tal como ilustrado na figura 19 ocorreu a linearização total da amostra, uma vez que só visualiza-se uma banda. Assim, pode-se concluir que não há presença de gDNA na amostra de mcDNA e que a presença das bandas poderá resultar de agregados de PP.

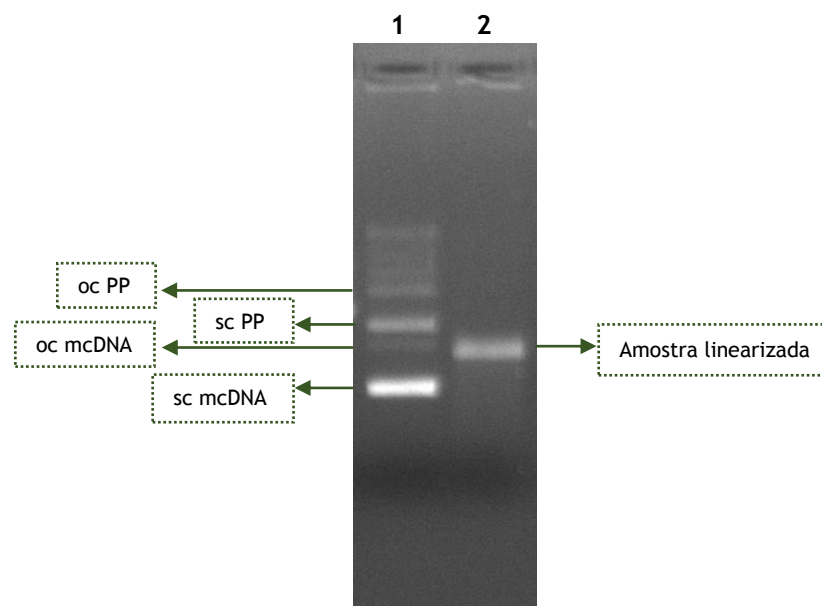


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose da amostra de mcDNA. Linha 1: Amostra de mcDNA recuperada com o kit da Qiagen. Linha 2: Amostra de mcDNA após ser linearizada, com a enzima BamHI.

3.3 Purificação do mcDNA

3.3.1 Coluna de troca aniónica

Com o objetivo de purificar o mcDNA utilizou-se um pack de duas colunas monolíticas (coluna de troca aniónica e coluna hidrofóbica), que estão indicadas para a purificação rápida e eficiente [5,62] de pDNA. Tal como descrito anteriormente, os monolitos apresentam inúmeras vantagens em relação às matrizes convencionais possibilitando a obtenção de melhores rendimentos [11,73]. Assim, representam uma notável opção quando pretende-se purificar biomoléculas.

Inicialmente, utilizou-se a coluna de troca aniónica com a finalidade de promover-se a eliminação do RNA presente na amostra de lisado, tal como sugeria o manual das colunas que contém a descrição do método usado na purificação de pDNA. Esta coluna contém um ligando de amina polimérica (dietilamina) carregada positivamente e que estabelece preferencialmente interações electrostáticas com os grupos fosfato, carregados negativamente, presentes no DNA [39,62].

Nos ensaios cromatográficos foi usada uma amostra de lisado para se ter uma ideia do perfil de retenção dos vários componentes da amostra.

Numa primeira fase foi avaliada a capacidade de ligação e de eluição da coluna, e como tal usou-se apenas a estratégia de eluição com dois patamares, equilibrando a coluna com 200 mM de Tris-HCl, a pH 8,0, com caudal de 1,0 mL/min. Assim, e após injeção de 500 µL de amostra ocorreu a ligação das diferentes biomoléculas. Posteriormente, promoveu-se a eluição com 1,0 M de NaCl, em 200 mM de Tris-HCl, a pH 8,0 (resultados não mostrados). O resultado da eletroforese em gel de agarose mostrou que todas as biomoléculas presentes na amostra de lisado foram eluídas a 1,0 M de NaCl. Assim, ficou confirmada a existência de interações electrostáticas entre as espécies presentes na amostra e os ligandos da matriz, pois só quando aplicada a fase móvel que contém o sal (NaCl) é que a atração electrostática é enfraquecida devido à competição, sendo promovida a eluição e recuperação das espécies retidas na coluna.

Novos ensaios cromatográficos foram realizados a fim de encontrarem-se as concentrações exatas que promovem a separação dos contaminantes do mcDNA. Assim, tentou-se promover a eluição imediata de RNA, tendo em consideração que as características da coluna induzem maior interação com o plasmídeo do que com o RNA. A coluna foi equilibrada com 500 mM de NaCl, em 200 mM de Tris-HCl, a pH 8,0. De seguida, injetou-se 500 µL de amostra de lisado tendo sido obtidos dois picos de espécies não retidas. Posteriormente, e depois de aumentar-se a força iónica para 1,0 M de NaCl eluiu um terceiro pico, tal como ilustrado na figura 20 (A). A fim de identificarem-se as espécies eluídas, em cada pico, foi efetuada uma eletroforese em gel de agarose que demonstrou que nos dois primeiros picos eluiu apenas o

RNA (Figura 20 (B), linhas 1 e 2) e no último pico elui o DNA, estando ainda presente uma grande fração de RNA (Figura 20 (B), linha 3).

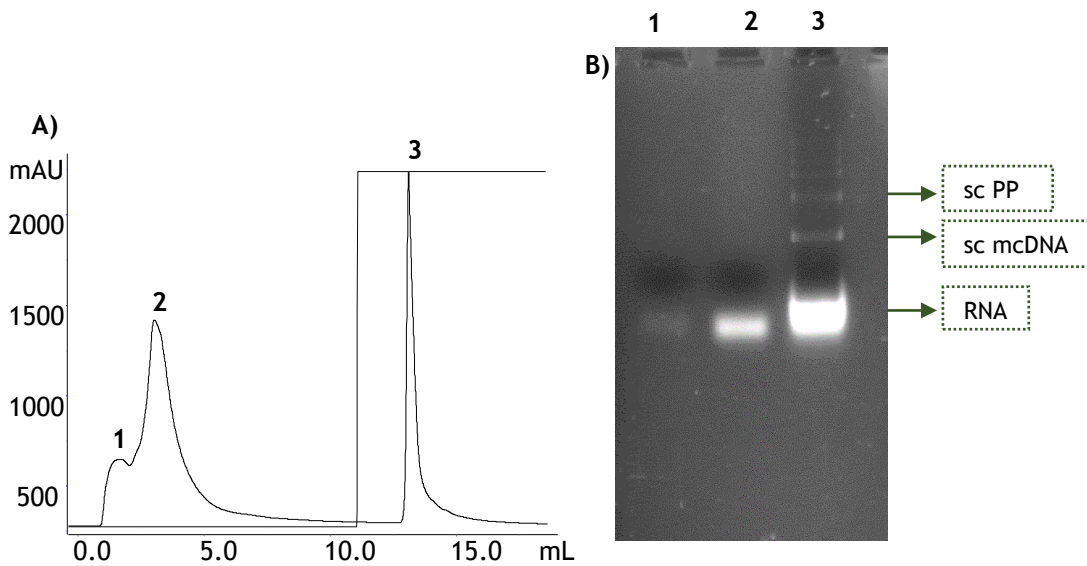


Figura 20. A) Cromatograma que representa a aplicação de uma amostra de lisado, numa coluna de troca aniônica. Foi aplicado um gradiente por passos a 500 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. Linha 1, 2 e 3: Frações correspondentes aos picos 1, 2 e 3 do cromatograma, respetivamente.

Tendo em consideração o resultado anterior conclui-se que 500 mM de NaCl não interfere com a ligação do mcDNA e do PP, porém não é suficiente para promover a eluição total do RNA. Assim, estes resultados sugerem que as moléculas de RNA interagem mais fracamente com o ligandos da coluna do que o DNA, logo um aumento do teor de sal durante o equilíbrio poderá promover a sua eluição completa. De notar, que as moléculas de RNA são carregadas negativamente, tal como o DNA, porém e atendendo que realizou-se uma lise alcalina modificada predomina na amostra injetada as biomoléculas de RNA de baixo peso molecular, o que justifica assim o facto de eluírem primeiro [20]. Outra conclusão que pode-se retirar dos resultados anteriores é que poderá haver a presença de várias espécies de RNA na amostra de lisado, isto porque as moléculas de RNA foram eluídas diferencialmente segundo várias condições de força iónica.

Na sequência do resultado anterior, novas experiências cromatográficas foram delineadas utilizando-se diferentes concentrações de NaCl (Tabela 10 e Figura 21), na tentativa de encontrar as melhores condições para a separação entre RNA e DNA. A escolha das concentrações de sal baseou-se na premissa de que forças iónicas mais baixas promovem interações mais fortes entre os ligandos e os ácidos nucleicos, e vice-versa [20,22].

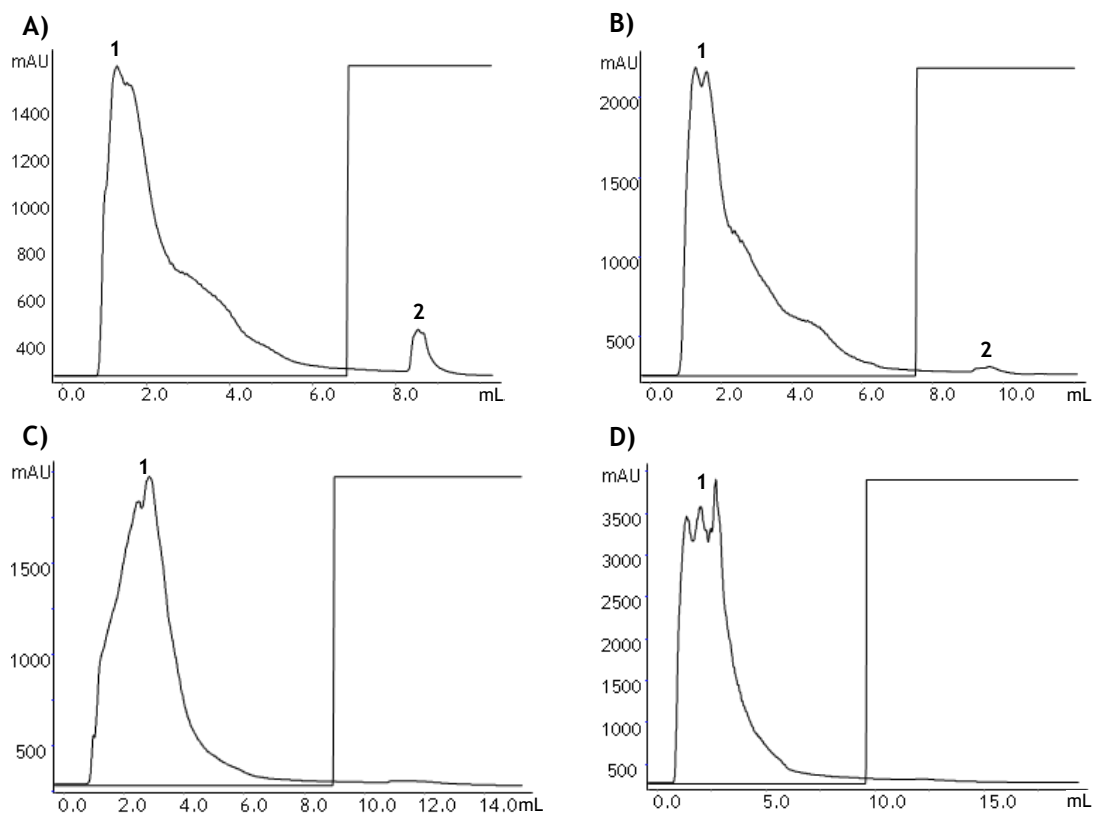


Figura 21. Cromatogramas representativos da injeção de 500 μ L de lisado no suporte monolítico de troca aniônica, usando diferentes gradientes de eluição. **A)** Gradiente por passos a 600 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM Tris-HCl, pH 8,0. **B)** Gradiente por passos a 630 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM Tris-HCl, pH 8,0. **C)** Gradiente por passos a 650 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM Tris-HCl, pH 8,0. **D)** Gradiente por passos a 750 mM e 1,0 M de NaCl, em 200 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Tabela 10. Resumo do efeito da concentração de sal na eluição e/ou retenção das diferentes biomoléculas, presentes numa amostra de lisado.

Biomoléculas presentes na amostra de lisado	Concentração de NaCl usada no passo de ligação			
	600 mM	630 mM	650 mM	750 mM
DNA	Retenção	Eluição/Retenção	Eluição	Eluição
RNA	Eluição/Retenção	Eluição/Retenção	Eluição	Eluição

Tendo em conta a figura 21 e a tabela 10 conclui-se que um aumento da concentração de sal promove mais eluição do RNA, porém quando utiliza-se uma concentração mais elevada com finalidade de promover-se uma eluição total desta biomolécula ocorre também eluição total do DNA, observando-se apenas um único pico nos cromatogramas (Figura 21 (C) e (D)).

Atendendo a que apenas a manipulação da concentração de sal não permitiu alcançar uma eficiente separação entre o RNA e o DNA foi testada a influência da concentração do tampão Tris-HCl, estudando a concentração de 100 mM. A hipótese seria que usando uma menor

concentração de Tris-HCl a ligação do DNA à coluna podia ser mais efetiva, o que poderia facilitar a separação entre o RNA e DNA.

Inicialmente foi utilizado um gradiente de NaCl já testado anteriormente e que tinha revelado uma separação parcial entre o RNA e o DNA. Assim, após injeção de 200 μ L de amostra de lisado, o passo de ligação foi promovido a 600 mM de NaCl, em 100 mM de Tris-HCl, a pH 8,0. Esta condição promoveu a eluição de algumas espécies, verificado pelo pico do cromatograma. De seguida, aumentou-se a força iónica para 1,0 M de NaCl o que levou à eluição de um segundo pico (Figura 22 (A)). A fim de averiguar-se as espécies que tinham eluído em cada pico efetuou-se uma eletroforese em gel de agarose. Tal como observado na figura 22 (B), no primeiro pico há apenas eluição de RNA e no segundo pico há eluição de DNA (PP e mcDNA) estando ainda presente o RNA. Fazendo uma comparação de resultados, conclui-se que a utilização de 100 mM de Tris-HCl é mais benéfica, pois nas mesmas condições não promove perdas de DNA no primeiro pico, favorecendo a sua retenção.

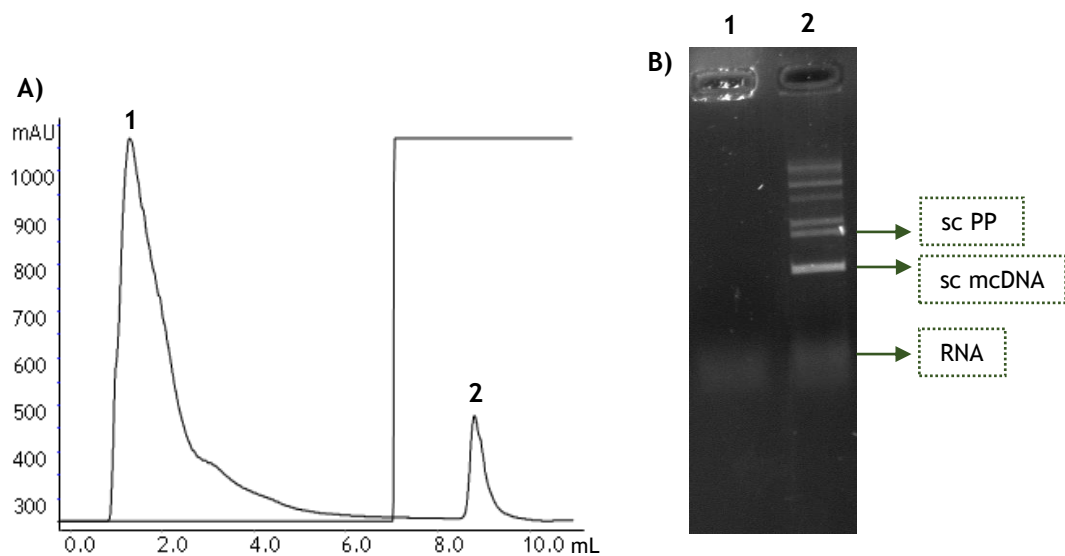


Figura 22. A) Cromatograma que representa a aplicação de uma amostra de lisado, numa coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente por passos a 600 mM e 1,0 M de NaCl, em 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. Linha 1 e 2: Frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

Tendo em consideração o resultado anterior efetuaram-se ensaios com esta concentração do tampão Tris-HCl, manipulando a concentração de sal no passo de equilíbrio e ligação na tentativa de promover-se a seletividade pretendida.

A primeira opção foi aumentar a concentração para 650 mM de NaCl, verificando-se a eluição de um pico. Com o aumento posterior da concentração de sal para 1,0 M de NaCl ocorreu eluição de um segundo pico, tal como apresentado na figura 23 (A).

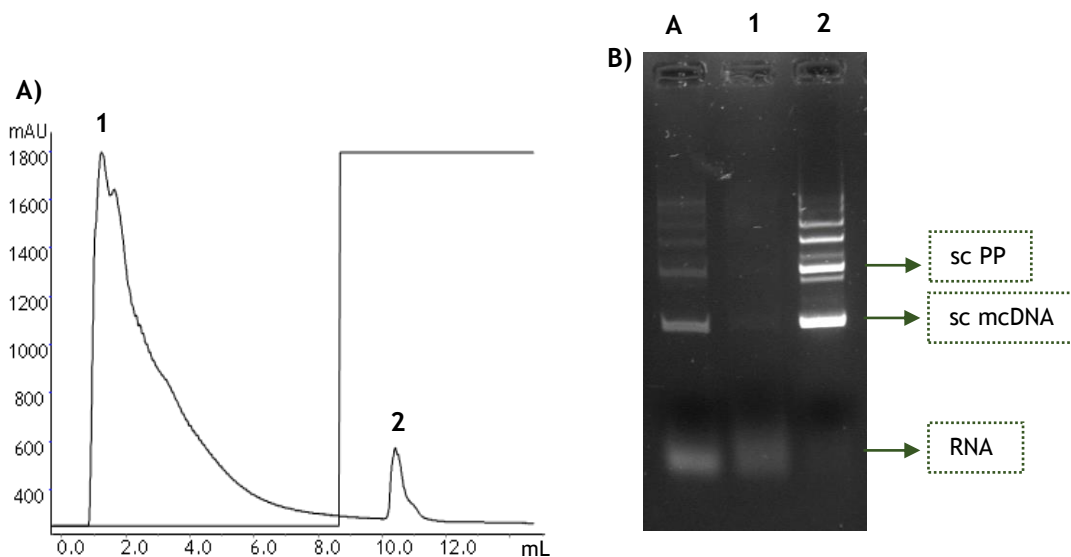


Figura 23. A) Cromatograma que representa a aplicação de uma amostra de lisado, numa coluna de troca aniônica. Foi aplicado um gradiente por passos a 650 mM e 1,0 M de NaCl, em 100 mM de Tris-HCl, pH 8,0. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1 e 2: Frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

O resultado da eletroforese revelou que para esta concentração de sal (650 mM) a retenção do DNA não é total, sendo parcialmente eluído no primeiro pico (Figura 23 (B), linha 1), no entanto, devido à presença de RNA no segundo pico (Figura 23 (B), linha 2), a concentração de NaCl foi ainda aumentada.

O ensaio foi realizado usando a concentração de 680 mM de NaCl, em 100 mM de Tris-HCl, a pH 8,0. À semelhança dos ensaios anteriores, foi obtido um primeiro pico nesta condição e um segundo pico com o aumento da concentração de sal para 1,0 M (Figura 24 (A)). Na figura 24 (B) é possível verificar que conseguiu-se a seletividade pretendida usando estas condições, uma vez que o RNA eluiu na totalidade no primeiro pico. Existe alguma perda de DNA no primeiro pico, porém não é significativa tendo em conta a sua recuperação no segundo pico e a eliminação do RNA.

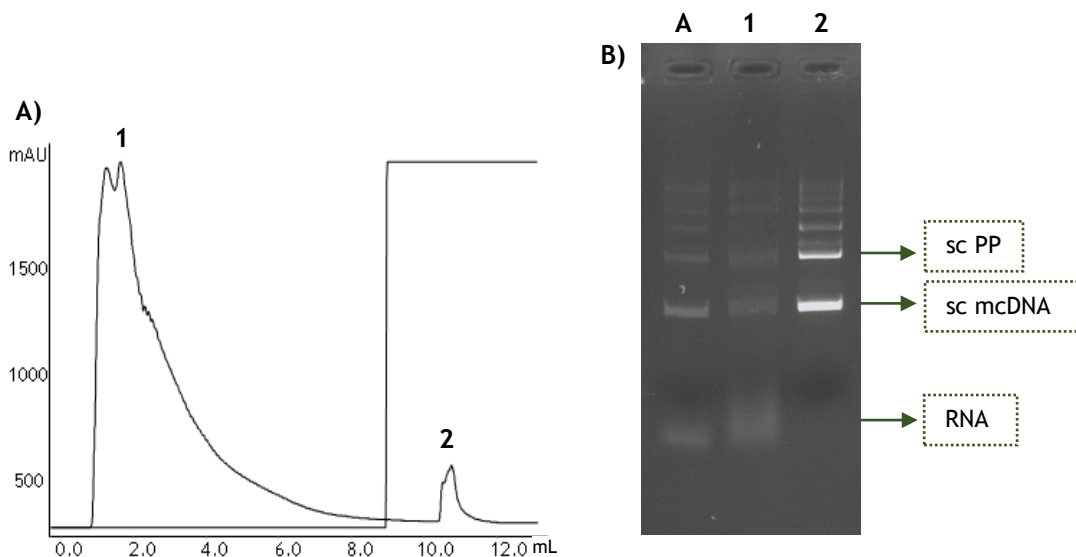


Figura 24. A) Cromatograma que representa a aplicação de uma amostra de lisado, numa coluna de troca aniônica. Foi aplicado um gradiente por passos a 680 mM e 1,0 M de NaCl, em 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1 e 2: Frações correspondentes aos picos 1 e 2 do cromatograma, respetivamente.

As instruções que acompanham o pack das duas colunas referem que com a coluna de troca aniônica obtém-se a seletividade entre o RNA e o DNA, e com a coluna hidrofóbica consegue-se a seletividade entre as isoformas de DNA, quando utilizada uma amostra de pDNA. Assim, e considerando o resultado anterior, conseguiu-se um passo importante que foi a separação do RNA do DNA usando uma amostra de mcDNA.

Apesar de ter-se concretizado o objetivo de seletividade proposto optou-se por testar novas condições que permitissem também promover a separação entre o PP e o mcDNA, e assim conseguir-se num só passo, e numa só coluna, a separação de todas as impurezas presentes na amostra de mcDNA. Para tal, efetuaram-se gradientes lineares uma vez que esta estratégia permite um aumento gradual da concentração de sal e é a mais adequada quando pretende-se conhecer o perfil de eluição das biomoléculas.

No primeiro ensaio cromatográfico realizado com a finalidade de promover-se a separação entre PP e mcDNA usou-se um gradiente linear de 670 mM a 1,0 M de NaCl, em 100 mM Tris-HCl, a pH 8,0, durante 15 minutos. A escolha deste gradiente baseou-se no resultado apresentado na figura 24. Assim, a ligeira diminuição da concentração de sal (de 680 mM para 670 mM) foi realizada com o objetivo de manter a seletividade entre RNA e DNA, e diminuir a perda de DNA no primeiro pico (resultados não mostrados). Por outro lado, a escolha de um gradiente linear até 100% tinha como objetivo compreender melhor o comportamento das biomoléculas e observar qual a percentagem a que eluíam.

O resultado revelou que 670 mM de NaCl no passo de ligação não é suficiente para a eluição de todo o RNA e que o DNA eluiu preferencialmente a 785 mM de NaCl. Assim, realizou-se um

novo ensaio onde equilibrou-se com a condição que promovia a eluição total de RNA no primeiro pico (680 mM de NaCl). Neste caso, aplicou-se um gradiente linear de 680 mM a 750 mM de NaCl, durante 15 minutos (resultados não mostrados). O resultado revelou que o RNA eluiu na totalidade no primeiro pico, tal como esperado, e que durante o gradiente linear conseguiu-se alguma seletividade entre as isoformas, quer do PP, quer do mcDNA. Assim, a 710 mM de NaCl eluiu a isoforma oc do PP e do mcDNA, e a 720 mM de sal eluíram as isoformas sc.

Esta ordem de eluição está de acordo com o descrito na literatura, uma vez que a isoforma sc é a mais compacta e devido às deformações induzidas pela tensão de torção [6,20] expõe em maior grau os grupos fosfato. Assim, apresenta uma maior densidade de carga por área de superfície o que permite estabelecer ligações mais fortes com o ligando da coluna [2,62].

Considerando o resultado anterior foram realizados mais alguns ensaios para otimizar a concentração de sal que conduzia à melhor seletividade entre as isoformas, tentando também promover a separação entre PP e mcDNA. Os melhores resultados relativos à seletividade entre isoformas foram conseguidos com a aplicação de um gradiente linear de 680 mM a 740 mM de NaCl, durante 15 minutos, tal como representado na figura 25.

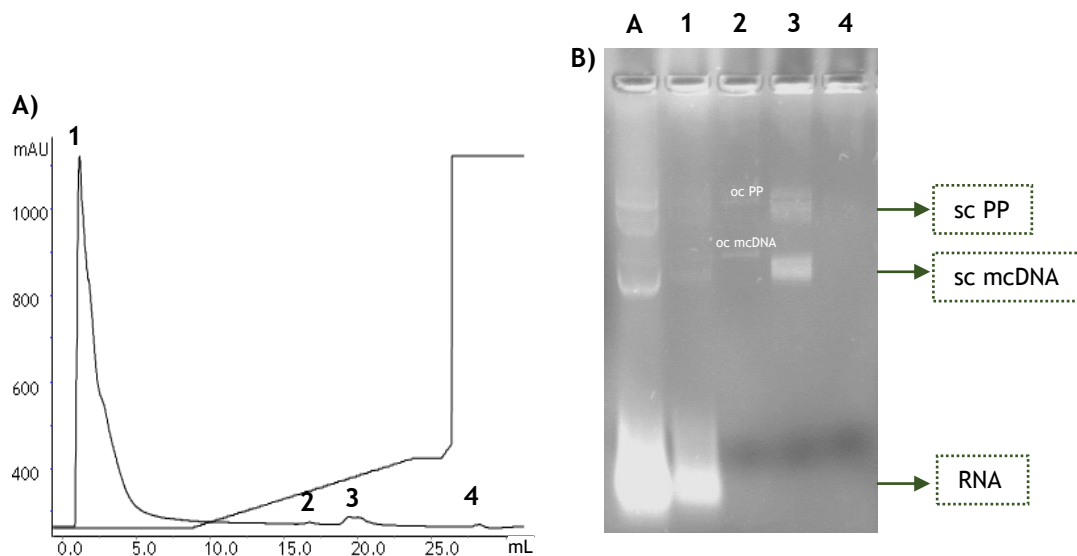


Figura 25. A) Cromatograma resultante da aplicação de uma amostra de lisado, na coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente linear de 680 mM a 740 mM de NaCl, em 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. No final foi realizado um passo a 1,0 M NaCl. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1, 2, 3 e 4: Frações correspondentes aos picos 1, 2, 3 e 4 do cromatograma, respetivamente.

Resumindo os resultados anteriores, conclui-se que com a coluna de troca aniónica conseguiu-se a seletividade entre o RNA e o DNA, e também entre as isoformas oc e sc, quer do PP, quer do mcDNA. Considerando o objetivo global de remover todas as impurezas da amostra de mcDNA faltava ainda conseguir a seletividade entre a isoforma sc do PP e a isoforma sc do mcDNA. Para tal, foram ainda efetuados alguns ensaios testando novas concentrações do

tampão Tris-HCl (50 mM e 10 mM), na tentativa de melhorar a retenção do mcDNA e consequentemente ter possibilidade de testar mais condições de eluição.

Então, para ambas as concentrações de Tris-HCl fez-se um ensaio utilizando o gradiente de NaCl do ensaio anterior e que apresenta-se na figura 26.

Segundo os resultados, a melhor concentração a utilizar é de 50 mM de Tris-HCl, uma vez que a utilização de 10 mM de Tris-HCl conduziu a uma retenção excessiva, inclusive de RNA que não se pretendia (Figura 26 (B)). No entanto, com a utilização da solução de 50 mM de Tris-HCl é possível estabelecer a separação das isoformas oc, e já observa-se o início de separação entre a isoforma sc do mcDNA e a sc do PP (Figura 26 (D)).

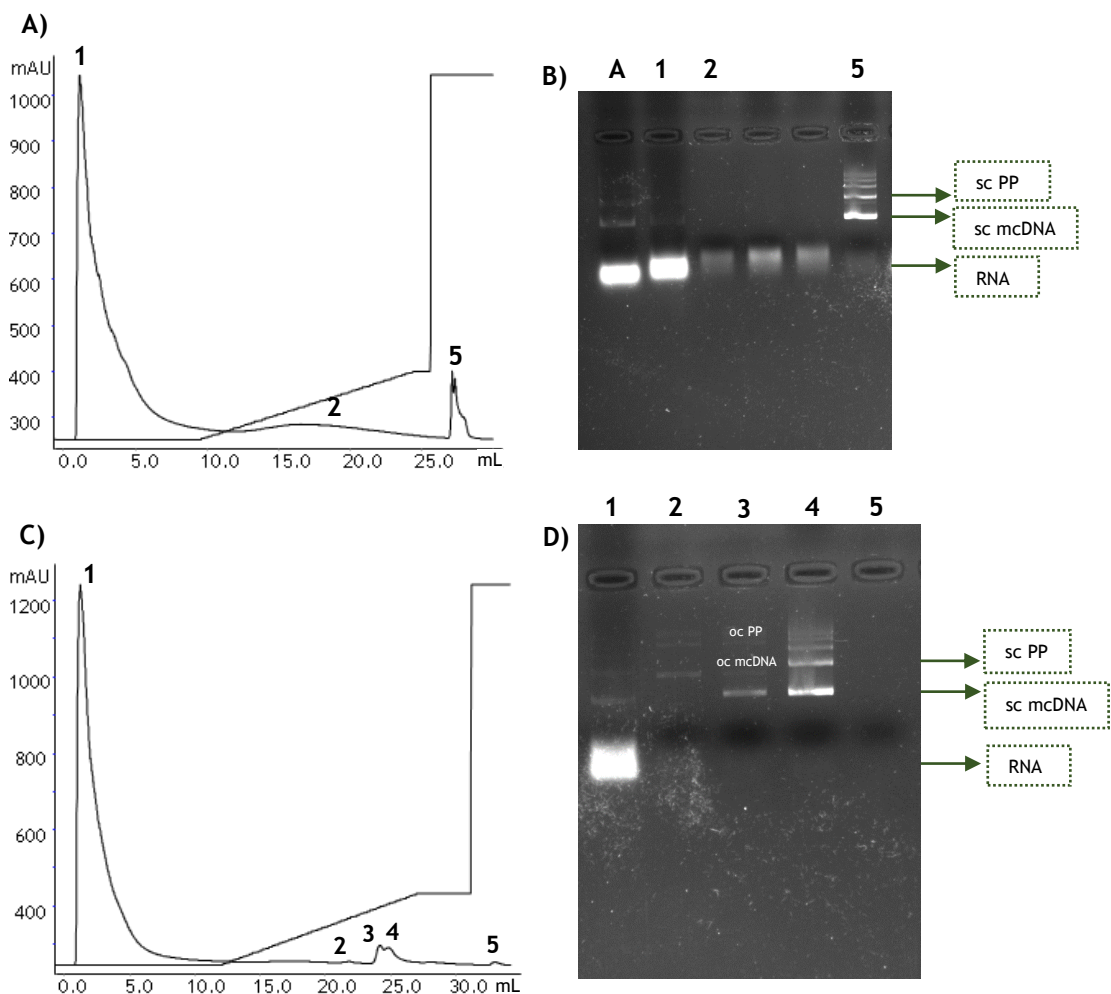


Figura 26. A) Cromatograma resultante da aplicação de um amostra de lisado, na coluna de troca aniônica. Foi aplicado um gradiente linear de 680 mM a 740 mM de NaCl, em 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0. No final do gradiente foi realizado um passo a 1,0 M de NaCl. B) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1, 2 e 5: Frações correspondentes aos picos 1, 2 e 5 do cromatograma, respetivamente. C) Cromatograma resultante da aplicação de um amostra de lisado, na coluna de troca aniônica. Foi aplicado um gradiente linear de 680 mM a 740 mM de NaCl, em 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. No final do gradiente foi realizado um passo a 1,0 M de NaCl. D) Análise de cada pico, observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. Linha 1, 2, 3, 4 e 5: Frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente.

Com a finalidade de obter-se a seletividade entre PP e mcDNA efetuaram-se vários ensaios. Após diversas tentativas de purificação testou-se a seguinte condição: gradiente linear de 700 mM a 750 mM de NaCl, em 50 mM Tris-HCl, a pH 8,0, realizando depois um patamar a 1,0 M de NaCl para promover a eluição de alguma espécie mais retida na coluna. Observando a figura 27 (B) linhas 3 e 4 conclui-se que esta condição promoveu seletividade entre as isoformas sc do PP e do mcDNA. Porém, ainda observa-se a co-eluição do sc do mcDNA com as isoformas oc do mcDNA e do PP. Assim, foi testado um aumento da concentração de sal no passo de ligação, pois as isoformas oc têm tendência a eluir primeiro e um aumento da concentração de NaCl poderá contribuir para esse efeito. Por outro lado, tentou-se promover a eluição total do RNA, pois observava-se ainda uma pequena sombra desta biomolécula durante o gradiente linear (Figura 27 (B), linhas 2 e 3). A presença de RNA durante o gradiente linear, mesmo utilizando uma concentração de sal superior à usada no ensaio de otimização da sua eluição, justifica-se pelo facto de serem usadas amostras de lisado distintas, que apesar de resultarem do mesmo processo e serem recuperadas segundo as mesmas condições podem ter ligeiras diferenças relativas às biomoléculas presentes.

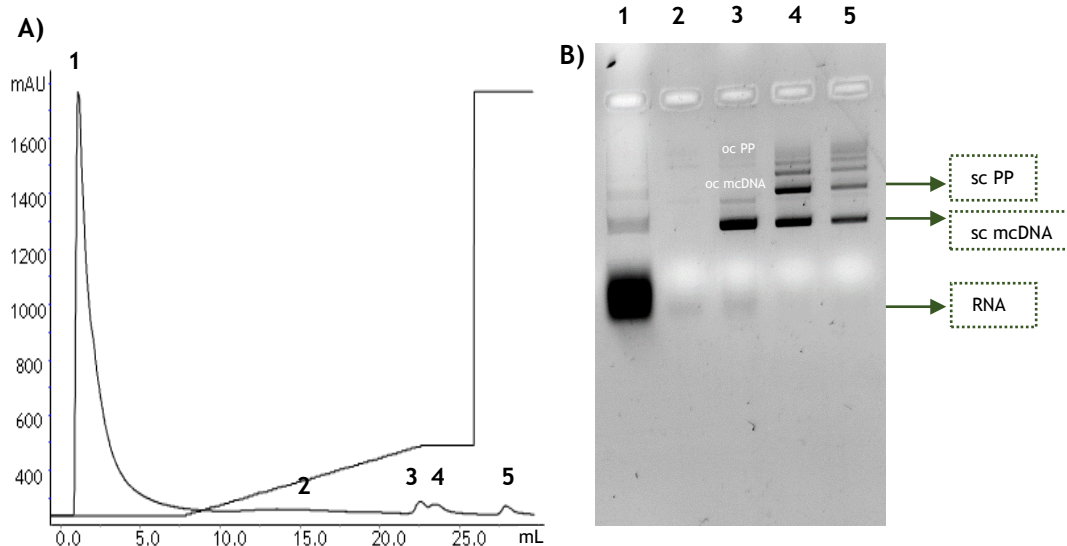


Figura 27. A) Cromatograma resultante da aplicação de lisado, na coluna de troca aniónica. Foi aplicado um gradiente linear de 700 mM a 750 mM de NaCl, em 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. No final foi realizado um passo a 1,0 M de NaCl. B) Análise de cada pico observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. Linha 1, 2, 3, 4 e 5: Frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente.

Tendo em conta o descrito, aumentou-se a concentração inicial para 710 mM de NaCl e fez-se um gradiente linear até 750 mM de NaCl, em 50 mM Tris-HCl, a pH 8,0, finalizando com um passo a 1,0 M de NaCl. Observando a figura 28 (B) conclui-se que conseguiu-se a seletividade pretendida quer entre o PP e mcDNA, quer entre o RNA e o mcDNA. Ou seja, apenas com o uso de uma coluna e num só passo cromatográfico conseguiu-se separar os contaminantes presentes na amostra de mcDNA.

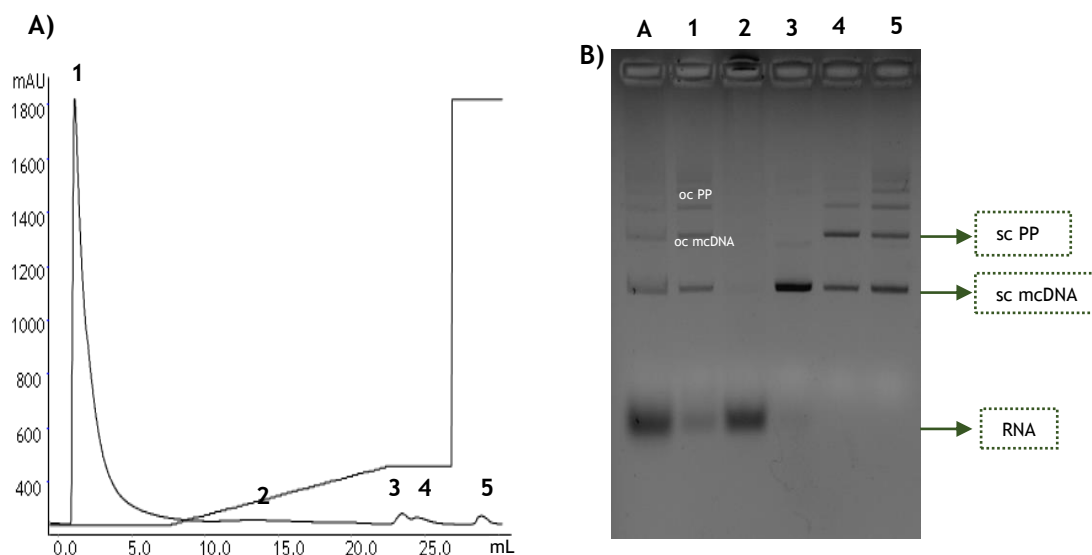


Figura 28. A) Cromatograma resultante da aplicação de lisado, na coluna de troca aniônica. Foi aplicado um gradiente linear de 710 mM a 750 mM de NaCl, em 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0. No final foi realizado um passo a 1,0 M de NaCl. B) Análise de cada pico observável no cromatograma, através da eletroforese em gel de agarose. A: Amostra de lisado de mcDNA que foi injetada na coluna; Linha 1, 2, 3, 4 e 5: Frações correspondentes aos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma, respetivamente.

De realçar, que visualiza-se a presença de uma pequena banda tênue de oc de mcDNA, que comparativamente à banda de sc de mcDNA não representa uma contaminação significativa. Também verificaram-se ligeiras perdas de sc do mcDNA, mas a recuperação isolada desta isoforma (Figura 28 (B), linha 3) é superior e muito significativa.

Segundo o conceito geral da cromatografia de troca aniônica a separação de biomoléculas baseia-se nas diferenças de carga, sendo as moléculas de menor densidade de carga eluídas em primeiro lugar. Contudo, existem outras variáveis que podem afetar a ordem de eluição, nomeadamente o tamanho e a conformação. Assim, e tendo em conta o referido anteriormente, poderá justificar-se a ordem com que foram eluídas as diferentes espécies. Em primeiro lugar eluiu o RNA que apesar de exibir carga negativa caracteriza-se por ser de baixo peso molecular, o que justifica a sua eluição precoce [20]. De seguida ocorre a eluição das isoformas oc. Neste caso, há que considerar a conformação, ou seja a isoforma sc é a mais compacta [6,20] e devido às deformações induzidas pela tensão de torção apresenta uma maior densidade de carga por área de superfície, conseguindo estabelecer ligações mais fortes com o ligando da coluna [2,6,62]. De seguida elui a isoforma sc do mcDNA e só depois há eluição da isoforma sc do PP. Isto pode ser justificado pelo tamanho destas biomoléculas que condiciona por sua vez a densidade de carga. Isto é, o mcDNA apresenta um tamanho molecular inferior ao PP, o que consequentemente faz com que o PP tenha maior carga negativa permitindo estabelecer interações mais fortes com o ligando.

A estratégia de purificação utilizada foi realizada em cerca de 30 minutos o que revela uma extrema vantagem comparativamente às matrizes convencionais, uma vez que o tempo de

contacto com o suporte monolítico é reduzido evitando alterações estruturais do mcDNA [5,62]. Outra vantagem inerente resultou de uma separação reprodutível usando baixa pressão e baixa concentração de NaCl, o que torna esta técnica mais económica e adequada para a purificação de biomoléculas.

3.4 Avaliação da pureza do mcDNA

A amostra de mcDNA sc resultante do processo cromatográfico usando a coluna de troca aniónica deve estar livre de impurezas, tal como recomendando pelas agências reguladoras. Assim, e com o objetivo de avaliar-se o nível de impurezas presentes efetuaram-se testes de quantificação para o gDNA, as proteínas e as endotoxinas.

Em relação à quantificação da isoforma sc de mcDNA não foi possível fazer-se por método cromatográfico, uma vez que não está definida nenhuma estratégia analítica. Assim, e de forma a poder-se avaliar de forma exata o teor de impurezas presentes na amostra de mcDNA sc purificada efetuou-se uma leitura espectrofotométrica, a 260 nm, para determinar-se a concentração de mcDNA presente no pico purificado e poder relacionar-se com o nível de impurezas presentes nessa mesma amostra. O resultado revelou que a amostra purificada tem uma concentração de mcDNA sc de 152 µg/mL.

Sabe-se que a presença de gDNA numa preparação de plasmídeo sc pode provocar necrose nas células do músculo-esquelético [48] e promover a formação de um tumor devido ao surgimento de oncogenes [5,20]. Assim, a sua quantificação é essencial de modo a avaliar a viabilidade da amostra de mcDNA sc na aplicação em testes *in vitro*. Inicialmente, e antes de proceder-se à quantificação foi necessário proceder-se à obtenção de uma amostra de gDNA do hospedeiro utilizado no trabalho. Assim, promoveu-se o crescimento celular da *E.coli* não transformada e efetuou-se a fermentação e recuperação celular por centrifugação. Posteriormente, o DNA genómico foi recuperado usando o kit Wizard de purificação de DNA genómico, da Promega. A amostra de gDNA recuperada foi usada na realização de um PCR de modo a avaliar-se se os primers disponíveis amplificavam o fragmento do gene do rRNA 16S. O resultado apresentado na figura 29 demonstra a amplificação do gDNA isolado do hospedeiro *E.coli* não transformada.

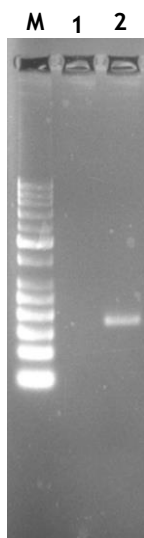


Figura 29. Análise da amplificação do gDNA, através da eletroforese em gel de agarose. M: Marcador; Linha 1: Controlo negativo; Linha 2: Amostra de gDNA amplificada.

Após a confirmação do resultado anterior procedeu-se à realização de PCR em tempo real e verificou-se que houve uma redução significativa do teor de gDNA presente na amostra de lisado (47,285 ng/ μ L) para a amostra de mcDNA sc purificada (0,1747 ng/ μ L). Assim, e fazendo a razão entre as concentrações de gDNA presentes nas amostras quantificadas concluiu-se que a coluna de troca aniónica foi eficiente na remoção desta impureza, pois ocorreu uma redução de aproximadamente 271 vezes da amostra de lisado para a amostra de mcDNA sc. Por outro lado, a amostra purificada cumpre com os limites estabelecidos em relação ao teor de gDNA, pois o valor obtido para a amostra de mcDNA sc purificada foi de 1,1493 ng/ μ g de mcDNA (Tabela 11).

A presença de proteínas na amostra de mcDNA sc foi também avaliada. A sua eliminação através de um processo cromatográfico é fundamental uma vez que a sua presença, numa amostra com finalidade terapêutica, pode desencadear reações alérgicas ou doenças auto-imunes [11,48]. Assim, as agências reguladoras definiram que o nível de proteínas deve ser indetetável na amostra final. Para a quantificação de proteínas utilizou-se um teste colorimétrico designado por micro-BCA. Os resultados revelaram novamente a eficiência da coluna de troca aniónica na remoção de impurezas, uma vez que a amostra de lisado apresentou 122,40 ug/mL de proteína e na amostra de mcDNA sc purificada as proteínas foram indetetáveis (Tabela 11).

A eliminação de endotoxinas é essencial, pois a principal endotoxina é o lipopolissacarídeo (LPS) que encontra-se presente na parede celular de bactérias gram negativas, nomeadamente em *E. coli*. A presença destas moléculas poderá afetar a eficiência de transfecção eucariótica [5,11,20], além de serem potentes estimuladores do sistema

imunitário. Neste caso, os resultados da quantificação, através do teste LAL, revelaram que o teor de endotoxinas diminuiu após a aplicação de um passo de cromatografia, e que o valor obtido na amostra de mcDNA sc purificada foi de 0,0101 EU/ug de mcDNA, pelo que obedece aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados das quantificações de gDNA, proteínas e endotoxinas, na amostra de sc de mcDNA purificada.

Impurezas quantificadas					
	Proteínas (µg/mL)	Endotoxinas		gDNA	
		[endotoxina] (EU/mL)	(EU/ug de mcDNA)	[gDNA] (ng/µL)	(ng/ug de mcDNA)
Amostra de lisado	122,40	14,239	-	47,285	-
Amostra de mcDNA sc	Indetetável	1,5414	0,0101	0,1747	1,1493
Valores regulamentados	Indetetável		<0,1 EU/µg plasmídeo		<2 ng/µg plasmídeo

Assim, pode-se concluir que a coluna de troca aniônica utilizada neste trabalho foi eficaz na remoção de impurezas permitindo ter uma amostra de mcDNA sc que cumpre com os critérios definidos pelas agências reguladoras, e que conseqüentemente poderá ser utilizada em estudos posteriores.

CAPÍTULO 4- Conclusões e perspectivas futuras

Em todo o mundo morrem milhares de pessoas devido a patologias que são incuráveis, através das terapias convencionais. Atendendo a que a saúde pública deve ser uma prioridade torna-se fundamental a implementação de estratégias terapêuticas alternativas. Assim, surgiu a terapia génica e as vacinas de DNA que tornaram-se alternativas promissoras no tratamento de doenças hereditárias e adquiridas. Nos últimos anos tem-se apostado no uso de vetores não virais devido às características vantajosas que lhes são inerentes, sendo que tem havido um interesse crescente na utilização do mcDNA. Este vetor além de ser mais seguro permite uma melhoria muito significativa na expressão do gene terapêutico. Para possível aplicação terapêutica é imprescindível a utilização da cromatografia, pois é o processo que permite a obtenção de uma amostra de DNA com elevado grau de pureza, obedecendo assim às normas definidas pelas entidades reguladoras.

O objetivo deste trabalho consistiu na otimização da produção do mcDNA e na implementação de uma abordagem cromatográfica para a sua purificação. Numa primeira fase, testaram-se diversas percentagens de indutor para produção de mcDNA e procedeu-se à otimização do processo de recuperação definindo as concentrações adequadas de NaCl para promover a sua ligação e eluição. Assim, concluiu-se que a utilização de uma mistura indutora constituída por meio LB e NaOH e suplementada com 0,01% de L-arabinose é a melhor estratégia de produção do mcDNA. E que as melhores condições para a recuperação desta biomolécula são 0,80 M e 1,75 M de NaCl, no tampão de lavagem e de eluição, respetivamente.

Numa segunda fase, utilizou-se uma coluna de troca aniónica que promove preferencialmente interações electroestáticas entre o ligando e a biomolécula-alvo. Realizaram-se diversos ensaios utilizando-se uma amostra complexa de lisado de forma a otimizar o processo cromatográfico. Foi concluído que usando um gradiente linear crescente de concentração de NaCl (710 mM a 750 mM, durante 15 minutos) é possível eliminar o RNA no passo de injeção e alcançar a seletividade pretendida para obter a isoforma sc do mcDNA. Posteriormente, e de forma a garantir que a amostra recuperada do processo de cromatografia cumpria os critérios definidos pelas agências reguladoras, procedeu-se a ensaios de quantificação de cada um dos contaminantes principais. Os testes de controlo de qualidade revelaram que o teor de gDNA (1,1493 ng/ug de mcDNA) e de endotoxinas (0,0101 EU/ug de mcDNA) estão dentro dos limites estabelecidos e que é indetetável a presença de RNA e de proteínas.

Como tal, e tendo em conta os resultados obtidos, pode-se afirmar que com o uso desta coluna monolítica consegue-se estabelecer uma estratégia que promove a seletividade entre as impurezas e o mcDNA, e que permite a separação das isoformas do vetor possibilitando a

recuperação isolada do mcDNA sc. Além disso, ao utilizar-se este suporte monolítico promoveu-se uma separação mais rápida, o que garante a estabilidade estrutural do vetor.

Resumindo, este estudo proporcionou a produção maioritária de mcDNA e o desenvolvimento de uma estratégia de cromatografia que possibilita a purificação da isoforma sc do mcDNA. Conseguiu-se assim dar um passo importante no que respeita à purificação deste vetor, pois até aos dias de hoje ainda não tinha sido implementada nenhuma estratégia de purificação.

Contudo, mais investigação é exigida, e um dos aspetos a explorar será a implementação de um método analítico que permita a quantificação de mcDNA. Para confirmar a robustez desta tecnologia poderiam ser também realizados ensaios com outras amostras de mcDNA, de diferentes tamanhos e composições. A comparação desta metodologia de purificação de mcDNA num único passo com a estratégia inicialmente proposta de aplicação das duas colunas deverá ser realizada, de forma a determinar a mais vantajosa em termos de tempo, custos, e pureza final do produto.

Na sequência da purificação do mcDNA sc é importante a realização de estudos *in vitro* de forma a avaliar a eficiência de transfecção e da expressão do gene, utilizando pela primeira vez uma amostra de mcDNA sc purificada através da cromatografia. Em associação a esta proposta será relevante também o desenvolvimento de novos métodos de entrega e de novas formulações que facilitem a entrega e ação do mcDNA, quer *in vitro*, quer *in vivo*.

Concluindo, com a otimização da estratégia de purificação do mcDNA comercial poder-se-á proceder a um estudo completo da eficiência deste vetor, modificado com um gene terapêutico, com a finalidade de tratar uma patologia.

Referências

- [1] K. H. Khan, "DNA vaccines: roles against diseases," *GERMS*, vol. 3, no. 1, pp. 26-35, 2013.
- [2] D. Bicho, Â. Sousa, F. Sousa, J. A. Queiroz, and C. T. Tomaz, "Effect of chromatographic conditions and plasmid DNA size on the dynamic binding capacity of a monolithic support," *J. Sep. Sci.*, vol. 00, pp. 1-9, 2014.
- [3] V. M. Gaspar, C. Cruz, A. Queiroz, C. Pichon, I. J. Correia, and F. Sousa, "Sensitive Detection of Peptide-Minicircle DNA Interactions by Surface Plasmon Resonance," *Anal. Chem.*, vol. 85, pp. 2304-2311, 2013.
- [4] A. Stryjewska, K. Kiepusa, T. Librowski, and S. Lochyński, "Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part II. Monoclonal antibodies, modern vaccines and gene therapy," *Pharmacol. Rep.*, vol. 65, no. 5, pp. 1086-1101, 2013.
- [5] Â. Sousa, C. T. Tomaz, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Successful application of monolithic innovative technology using a carbonyldiimidazole disk to purify supercoiled plasmid DNA suitable for pharmaceutical applications," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 46, pp. 8333-8343, 2011.
- [6] Â. Sousa, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Biorecognition of supercoiled plasmid DNA isoform in lysine-affinity chromatography," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 27, pp. 3257-3260, 2009.
- [7] T. Wang, J. R. Upponi, and V. P. Torchilin, "Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies," *Int. J. Pharm.*, vol. 427, no. 1, pp. 3-20, 2012.
- [8] Q. Wan, L. Xie, L. Gao, Z. Wang, X. Nan, H. Lei, X. Long, Z. -Y. Chen, C. -Y. He, G. Liu, X. Liu, and B. Qiu, "Self-assembled magnetic theranostic nanoparticles for highly sensitive MRI of minicircle DNA delivery," *Nanoscale*, vol. 5, pp. 744-752, 2013.
- [9] E. G. Rodríguez, "Nonviral DNA vectors for immunization and therapy: design and methods for their obtention," *J. Mol. Med.*, vol. 82, no. 8, pp. 500-509, 2004.
- [10] F. Silva, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues, "Plasmid DNA fermentation strategies: influence on plasmid stability and cell physiology," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 6, pp. 2571-2580, 2012.
- [11] A. Soares, J. A. Queiroz, F. Sousa, and Â. Sousa, "Purification of human papillomavirus 16 E6/E7 plasmid deoxyribonucleic acid-based vaccine using an arginine modified monolithic support," *J. Chromatogr. A*, vol. 1320, pp. 72-79, 2013.
- [12] G. A. L. Gonçalves, K. L. J. Prather, G. A. Monteiro, A. E. Carnes, and D. M. F. Prazeres, "Plasmid DNA production with *Escherichia coli* GALG20, a *pgi*-gene knockout strain: Fermentation strategies and impact on downstream processing," *J. Biotechnol.*, vol. 186, pp. 119-127, 2014.
- [13] C. Caramelo-Nunes, P. Almeida, J. C. Marcos, and C. T. Tomaz, "Specific recognition of supercoiled plasmid DNA by affinity chromatography using the intercalator DAPP as ligand," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 928, pp. 121-124, 2013.

- [14] D. M. Bower and K. L. J. Prather, "Engineering of bacterial strains and vectors for the production of plasmid DNA," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, no. 5, pp. 805-813, 2009.
- [15] K. B. Kaufmann, H. Büning, A. Galy, A. Schambach, and M. Grez, "Gene therapy on the move," *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 11, pp. 1642-1661, 2013.
- [16] W. Wang, W. Li, N. Ma, and G. Steinhoff, "Non-Viral Gene Delivery Methods," *Current Pharmaceutical Biotechnol.*, vol. 14, pp. 46-60, 2013.
- [17] D. Sen, B. Balakrishnan, and G. R. Jayandharan, "Cellular unfolded protein response against viruses used in gene therapy," *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. 250, pp. 1-16, 2014.
- [18] L. Gao, L. Xie, X. Long, Z. Wang, C. -Y. He, Z. -Y. Chen, L. Zhang, X. Nan, H. Lei, X. Liu, G. Liu, J. Lu, and B. Qiu, "Efficacy of MRI visible iron oxide nanoparticles in delivering minicircle DNA into liver via intrabiliary infusion," *Biomaterials*, vol. 34, no. 14, pp. 3688-3696, 2013.
- [19] S. Stenler, O. P. Wiklander, M. Badal-Tejedor, J. Turunen, J. Z. Nordin, D. Hallengard, B. Wahren, S. E. Andaloussi, M. W. Rutland, C. E. Smith, K. E. Lundin, and P. Blomberg, "Micro-minicircle Gene Therapy: Implications of Size on Fermentation, Complexation, Shearing Resistance, and Expression," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 2, pp. e140, 2013.
- [20] D. M. F. Prazeres, G. N. M. Ferreira, G. A. Monteiro, C. L. Cooney, and J. M. S. Cabral, "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks," *Trends Biotechnol.*, vol. 17, no. 4, pp. 169-174, 1999.
- [21] G. N. Ferreira, G. A. Monteiro, D. M. F. Prazeres, and J. M. S. Cabral, "Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications," *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 9, pp. 380-388, 2000.
- [22] D. M. F. Prazeres and G. N. M. Ferreira, "Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination," *Chem. Eng. Process.*, vol. 43, no. 5, pp. 615-630, 2004.
- [23] N. Miller and R. Vile, "Targeted vectors for gene therapy," *FASEB J.*, vol. 9, pp. 190-199, 1995.
- [24] M. J. Osborn, R. T. Mcelmurry, C. J. Lees, A. P. Defeo, Z. -Y. Chen, M. A. Kay, L. Naldini, G. Freeman, J. Tolar, and B. R. Blazar, "Minicircle DNA-based Gene Therapy Coupled With Immune Modulation Permits Long-term Expression of α - L -Iduronidase in Mice With Mucopolysaccharidosis Type I," *Mol. Ther.*, vol. 19, no. 3, pp. 450-460, 2011.
- [25] F. Silva, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues, "Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 691-708, 2012.
- [26] N. Nafissi, S. Alqawlaq, E. A. Lee, M. Foldvari, P. A. Spagnuolo, and R. A. Slavcev, "DNA Ministrings: Highly Safe and Effective Gene Delivery Vectors," *Mol. Ther. Nucleic Acids*, vol. 3, no. 5, pp. e165, 2014.
- [27] N. Nafissi and R. Slavcev, "Construction and Characterization of an *in-vivo* Linear Covalently Closed DNA Vector Production System," *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 154, pp. 2-13, 2012.

- [28] C. Zhang, S. Gao, W. Jiang, S. Lin, F. Du, Z. Li, and W. Huang, "Targeted minicircle DNA delivery using folate-poly(ethylene glycol)- polyethylenimine as non-viral carrier," *Biomaterials*, vol. 31, no. 23, pp. 6075-6086, 2010.
- [29] K. J. Prather, S. Sagar, J. Murphy, and M. Chartrain, "Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 33, no. 7, pp. 865-883, 2003.
- [30] Q. Wang, W. Jiang, Y. Chen, P. Liu, C. Sheng, S. Chen, H. Zhang, C. Pan, S. Gao, and W. Huang, "In Vivo Electroporation of Minicircle DNA as a Novel Method of Vaccine Delivery To Enhance HIV-1-Specific Immune Responses," *J. Virol.*, vol. 88, no. 4, pp. 1924-1934, 2014.
- [31] S. Flingai, M. Czerwonko, J. Goodman, S. B. Kudchodkar, K. Muthumani, and D. B. Weiner, "Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants," *Front. Immunol.*, vol. 4, no. 354, pp. 1-10, 2013.
- [32] F. Saade and N. Petrovsky, "Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines," *Expert Rev. Vaccines*, vol. 11, no. 2, pp. 189-209, 2012.
- [33] G. Wang, L. Pan, and Y. Zhang, "Approaches to improved targeting of DNA vaccines," *Hum. Vaccin.*, vol. 7, no. 12, pp. 1271-1281, 2011.
- [34] B. Ferraro, M. P. Morrow, N. A. Hutnick, T. H. Shin, C. E. Lucke, and D. B. Weiner, "Clinical applications of DNA vaccines: Current progress," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 53, no. 3, pp. 296-302, 2011.
- [35] C. Coban, K. Kobiyama, N. Jounai, M. Tozuka, and K. J. Ishii, "DNA vaccines: A simple DNA sensing matter?," *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 9, no. 10, pp. 2216-2221, 2013.
- [36] C. Guo, M. H. Manjili, J. R. Subjeck, D. Sarkar, P. B. Fisher, and X. -Y. Wang, "Therapeutic cancer vaccines. Past, present, and future," *Adv. Cancer Res.*, vol. 119, no. 804, pp. 421-475, 2013.
- [37] L. Li, F. Saade, and N. Petrovsky, "The future of human DNA vaccines," *J. Biotechnol.*, vol. 162, pp. 171-182, 2012.
- [38] M. Huang, Z. Chen, S. Hu, F. Jia, Z. Li, G. Hoyt, R. C. Robbins, M. A. Kay, and J. C. Wu, "Novel Minicircle Vector for Gene Therapy in Murine Myocardial Infarction," *Circulation*, vol. 120, no. Suppl 11, pp. S230-S237, 2009.
- [39] J. Stadler, R. Lemmens, and T. Nyhammar, "Plasmid DNA purification," *J. Gene Med.*, vol. 6, no. Suppl 1, pp. S54-S66, 2004.
- [40] X. Gao, K. -S. Kim, and D. Liu, "Nonviral gene delivery: What We Know and What Is Next," *AAPS J.*, vol. 9, no. 1, pp. E92-E104, 2007.
- [41] M. Schleef and M. Schmeer, "Minicircle - Die nächste Generation nicht-viraler Genterapie- Vektoren," *Pharm. Unserer Zeit*, vol. 40, no. 3, pp. 220-224, 2011.
- [42] L. Vannucci, M. Lai, F. Chiappesi, L. Ceccherini-Nelli, and M. Pistello, "Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology," *New Microbiol.*, vol. 36, no. 1, pp. 1-22, 2013.

- [43] A. Baldo, E. Van Den Akker, H. E. Bergmans, F. Lim, and K. Pauwels, "General Considerations on the Biosafety of Virus-derived Vectors Used in Gene Therapy and Vaccination," *Current Gene Therapy*, vol. 13, pp. 385-394, 2013.
- [44] J. L. Melnick, "Virus vaccines: principles and prospects," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 67, no. 2, pp. 105-112, 1989.
- [45] T. -Y. Chang, C. -Y. Chung, W. -M. Chuang, L. -Y. Li, L. -B. Jeng, and W. -L. Ma, "Durable Expression of Minicircle DNA-Liposome-Delivered Androgen Receptor cDNA in Mice with Hepatocellular Carcinoma," *Biomed. Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1-9, 2014.
- [46] E. Basner-Tschakarjan and F. Mingozzi, "Cell-mediated immunity to AAV vectors, evolving concepts and potential solutions," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. 350, pp. 1-10, 2014.
- [47] J. Skubis-Zegadło, A. Stachurska, and M. Małecki, "VECTROLOGY OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES (AAV)," *Med. Wieku Rozwoj.*, vol. 17, no. 3, pp. 202-206, 2013.
- [48] Â. Sousa, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Impact of lysine-affinity chromatography on supercoiled plasmid DNA purification," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 879, no. 30, pp. 3507-3515, 2011.
- [49] L. E. G. Maniar, J. M. Maniar, Z. -Y. Chen, J. Lu, A. Z. Fire, and M. A. Kay, "Minicircle DNA Vectors Achieve Sustained Expression Reflected by Active Chromatin and Transcriptional Level," *Molecular Therapy*, vol. 21, no. 1, pp. 131-138, 2013.
- [50] V. Gaspar, D. De Melo-Diogo, E. Costa, A. Moreira, J. Queiroz, C. Pichon, I. Correia, and F. Sousa, "Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 15, no. 3, pp. 1-27, 2014.
- [51] D. Kobelt, M. Schleef, M. Schmeer, J. Aumann, P. M. Schlag, and W. Walther, "Performance of High Quality Minicircle DNA for In Vitro and In Vivo Gene Transfer," *Mol. Biotechnol.*, vol. 53, no. 1, pp. 80-89, 2013.
- [52] C. Nunes, Â. Sousa, J. C. Nunes, A. M. Morão, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Supercoiled plasmid DNA purification by integrating membrane technology with a monolithic chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 37, no. 11, pp. 1229-1236, 2014.
- [53] C. -W. Chang, L. V. Christenen, M. Lee, and S. W. Kim, "Efficient Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Using Minicircle DNA for Angiogenic Gene Therapy," *J. Control Release*, vol. 125, no. 2, pp. 155-163, 2008.
- [54] S. Chabot, J. Orio, M. Schmeer, M. Schleef, M. Golzio, and J. Teissie, "Minicircle DNA electrotransfer for efficient tissue-targeted gene delivery," *Gene Therapy*, vol. 20, pp. 62-68, 2013.
- [55] V. M. Gaspar, F. Sousa, J. A. Queiroz, and I. J. Correia, "Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications," *Nanotechnology*, vol. 22, no. 1, pp. 1-12, 2011.
- [56] J. -Y. Bouet and D. Lane, "Molecular Basis of the Supercoil Deficit Induced by the Mini-F Plasmid Partition Complex," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, pp. 165-173, 2009.
- [57] N. Nafissi, C. H. Sum, S. Wettig, and R. A. Slavcev, "Optimization of a One-Step Heat-Inducible *In Vivo* Mini DNA Vector Production System," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, pp. e89345, 2014.

- [58] É. Mota, Â. Sousa, U. Černigoj, J. A. Queiroz, C. T. Tomaz, and F. Sousa, "Rapid quantification of supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid using a monolithic ion exchanger," *J. Chromatogr. A*, vol. 1291, pp. 114-121, 2013.
- [59] P. Mayrhofer, M. Blaesens, M. Schleef, and W. Jechlinger, "Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein - DNA interaction chromatography," *J. Gene Med.*, vol. 10, no. 6, pp. 1253-1269, 2008.
- [60] W. M. Dietz, N. E. B. Skinner, S. E. Hamilton, M. D. Jund, S. M. Heitfeld, A. J. Litterman, P. Hwu, Z. -Y. Chen, A. M. Salazar, J. R. Ohlfest, B. R. Blazar, C. A. Pennell, and M. J. Osborn, "Minicircle DNA is Superior to Plasmid DNA in Eliciting Antigen-specific CD8 + T-cell Responses," *Molecular Therapy*, vol. 21, no. 8, pp. 1526-1535, 2013.
- [61] J. Urthaler, W. Buchinger, and R. Necina, "Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 52, no. 3, pp. 703-711, 2005.
- [62] Â. Sousa, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3046-3058, 2012.
- [63] O. E. Tolmachov, "Tightly-wound miniknot vectors for gene therapy: A potential improvement over supercoiled minicircle DNA," *Med. Hypotheses*, vol. 74, no. 4, pp. 702-704, 2010.
- [64] Â. Sousa, D. Bicho, C. T. Tomaz, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Performance of a non-grafted monolithic support for purification of supercoiled plasmid DNA," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 13, pp. 1701-1706, 2011.
- [65] Â. Sousa, A. M. Almeida, U. Černigoj, F. Sousa, and J. A. Queiroz, "Histamine monolith versatility to purify supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid from *Escherichia coli* lysate," *J. Chromatogr. A*, vol. 1355, pp. 125-133, 2014.
- [66] Y. Dong, A. Aied, J. Li, Q. Wang, X. Hu, and W. Wang, "An *in vitro* approach for production of non-scar minicircle DNA vectors," *J. Biotechnol.*, vol. 166, no. 3, pp. 84-87, 2013.
- [67] N. S. Ata-Abadi, K. Dormiani, Y. Khazaie, K. Ghaedi, M. Forouzanfar, L. Lachinani, N. Rezaei, A. Kiani-Esfahani, and M. H. Nasr-Esfahani, "Construction of a new minicircle DNA carrying an enhanced green fluorescent protein reporter gene for efficient expression into mammalian cell lines," *Mol. Biol. Rep.*, 2015.
- [68] C. Caramelo-Nunes, D. Bicho, P. Almeida, J. C. Marcos, and C. T. Tomaz, "Dynamic binding capacity and specificity of 3,8-diamino-6-phenylphenanthridine-Sepharose support for purification of supercoiled plasmid deoxyribonucleic acid," *J. Chromatogr. A*, vol. 1307, pp. 91-98, 2013.
- [69] I. M. Bird, "High performance liquid chromatography: principles and clinical applications," *BMJ*, vol. 299, no. 6702, pp. 783-787, 1989.
- [70] D. S. Hage, J. A. Anguizola, C. Bi, R. Li, R. Matsuda, E. Papastavros, E. Pfaunmiller, J. Vargas, and X. Zheng, "PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS OF AFFINITY CHROMATOGRAPHY : RECENT TRENDS AND DEVELOPMENTS," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, no. 69, pp. 93-105, 2012.

- [71] E. L. Pfaunmiller, M. L. Paulemond, C. M. Dupper, and D. S. Hage, "Affinity monolith chromatography: A review of principles and recent analytical applications," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 7, pp. 2133-2145, 2013.
- [72] D. S. Hage, "Affinity chromatography: A Review of Clinical Applications," *Clin. Chem.*, vol. 45, no. 5, pp. 593-615, 1999.
- [73] J. Krenkova and F. Svec, "Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology," *J. Sep. Sci.*, vol. 32, pp. 706-718, 2009.
- [74] B. W. Bigger, O. Tolmachov, J. -M. Collombet, M. Fragkos, I. Palaszewski, and C. Coutelle, "DNA: REPLICATION REPAIR AND RECOMBINATION: An *araC*-controlled Bacterial *cre* Expression System to Produce DNA Minicircle Vectors for Nuclear and Mitochondrial Gene Therapy," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 25, pp. 23018-23027, 2001.
- [75] W. Jechlinger, C. A. Tabrizi, W. Lubitz, and P. Mayrhofer, "Minicircle DNA Immobilized in Bacterial Ghosts: In vivo Production of Safe Non-Viral DNA Delivery Vehicles," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 8, pp. 222-231, 2004.
- [76] V. M. Gaspar, C. J. Maia, J. A. Queiroz, C. Pichon, I. J. Correia, and F. Sousa, "Improved Minicircle DNA Biosynthesis for Gene Therapy Applications," *Hum. Gene Ther. Methods*, vol. 25, pp. 93-105, 2014.
- [77] A. -M. Darquet, R. Rangara, P. Kreiss, B. Schwartz, S. Naimi, P. Delaère, J. Crouzet, and D. Scherman, "Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer," *Gene Ther.*, vol. 6, no. 2, pp. 209-218, 1999.
- [78] A. -M. Darquet, B. Cameron, P. Wils, D. Scherman, and J. Crouzet, "A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle," *Gene Ther.*, vol. 4, no. 12, pp. 1341-1349, 1997.
- [79] Z. -Y. Chen, C. -Y. He, A. Ehrhardt, and M. A. Kay, "Minicircle DNA Vectors Devoid of Bacterial DNA Result in Persistent and High-Level Transgene Expression in Vivo," *Mol. Therapy*, vol. 8, no. 3, pp. 495-500, 2003.
- [80] N. R. Cozzarelli, R. B. Kelly, and A. Kornberg, "A MINUTE CIRCULAR DNA FROM ESCHERICHIA COLI 15," *Biochemistry*, vol. 60, pp. 992-999, 1968.
- [81] W. Goebel and H. Schrempf, "Isolation of Minicircular Deoxyribonucleic Acids from Wild Strains of *Escherichia coli* and their Relationship to other Bacterial Plasmids," *J. Bacteriol.*, vol. 111, no. 3, pp. 696-704, 1972.
- [82] J. Messing, W. L. Staudenbauer, and P. H. Hofschneider, "Replication of the minicircular DNA of *Escherichia coli* 15. Properties of newly replicated open circular DNA molecules," *Eur. J. Biochem.*, vol. 44, no. 1, pp. 293-297, 1974.
- [83] C. S. Yoon, H. S. Jung, M. J. Kwon, S. H. Lee, C. W. Kim, M. K. Kim, M. Lee, and J. H. Park, "Sonoporation of the Minicircle-VEGF¹⁶⁵ for Wound Healing of Diabetic Mice," *Pharm. Research*, vol. 26, no. 4, pp. 794-801, 2009.
- [84] M. A. Kay, C. -Y. He, and Z. -Y. Chen, "A Simple And Rapid Minicircle DNA Vector Manufacturing System," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 12, pp. 1287-1289, 2010.
- [85] V. M. Gaspar, C. Gonçalves, D. De Melo-diogo, E. C. Costa, J. A. Queiroz, C. Pichon, F. Sousa, and I. J. Correia, "Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-PLA-g-PEI amphiphilic triblock

micelles for co-delivery of minicircle DNA and chemotherapeutics,” *J. Control. Release*, vol. 189, pp. 90-104, 2014.

- [86] S. Liu, J. Ma, W. Wang, M. Zhang, Q. Xin, S. Peng, R. Li, and H. Zhu, “Mutational Analysis of Highly Conserved Residues in the Phage PhiC31 Integrase Reveals Key Amino Acids Necessary for the DNA Recombination,” *PLoS One*, vol. 5, no. 1, pp. e8863, 2010.
- [87] Z. -Y. Chen, C. -Y. He, and M. A. Kay, “Improved Production and Purification of Minicircle DNA Vector Free of Plasmid Bacterial Sequences and Capable of Persistent Transgene Expression *In Vivo*,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 16, no. 1, pp. 126-131, 2005.
- [88] M. A. Kay, C. -Y. He, and Z. -Y. Chen, “A robust system for production of minicircle DNA vectors,” *Nat. Biotechnol.*, pp. 1-5, 2010.
- [89] K. H. Narsinh, F. Jia, R. C. Robbins, M. A. Kay, M. T. Longaker, and J. C. Wu, “Generation of Adult Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Non-Viral Minicircle DNA Vectors,” *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 1, pp. 78-88, 2011.
- [90] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, G. A. Monteiro, S. A. Martins, G. N. Ferreira, and D. M. Prazeres, “Purification of a Cystic Fibrosis Plasmid Vector for Gene Therapy Using Hydrophobic Interaction Chromatography,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 68, no. 5, pp. 576-583, 2000.