



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Bioreconhecimento de DNA minicircular por derivados de aminoácidos immobilizados em suportes monolíticos

Vânia Nascimento Pais

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

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

Covilhã, Outubro de 2016

Para as pessoas mais importantes
da minha vida e que eu amo mesmo muito
Os meus pais e a minha irmã

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à Professora Doutora Fani Sousa e à Professora Doutora Ângela Sousa por possibilitarem o desenvolvimento deste projeto. Agradeço toda a ajuda e conhecimento que me transmitiram que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, mas agradeço também todas as palavras amigas e por acreditarem nas minhas capacidades e darem-me força para continuar.

Agradeço à Universidade da Beira Interior, especialmente ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde por proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço à Margarida Almeida, à Joana Valente e à Patrícia Pereira por toda a ajuda e experiência partilhada. Pelo apoio em todos os momentos de trabalho, mas também pela força, palavras amigas e carinho partilhado.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório que me apoiaram sempre, quer em momentos de trabalho quer em momentos de descontração, por todos os bons momentos e conversas.

Agradeço a todos os meus amigos, que me apoiaram sempre, que nunca me deixaram desistir nem duvidar das minhas capacidades. Agradeço do fundo do coração às minhas amigas do terceiro direito, aos meus amigos do Teixoso e aos meus amigos de coração que conheci na faculdade.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou, especialmente aos meus pais e irmã. Sem eles não teria sido possível, agradeço por nunca duvidarem de mim e por toda a força que me deram, por me incentivarem a continuar sempre, mesmo quando a meta parecia mais longe e por vezes até inalcançável. Agradeço todo o carinho que demonstraram sempre, todas as palavras de amor e todos os sorrisos. Tenho muito orgulho em vocês. Amo-vos do fundo do meu coração.

Resumo

Atualmente existem diversas patologias que afetam a sociedade, cujas terapias disponíveis não são adequadas, vitimando uma parte da população. A terapia gênica e as vacinas de DNA são uma alternativa promissora que visa a administração de DNA que permite que o organismo expresse dada proteína/informação necessária para o tratamento da doença. Os plasmídeos têm sido o meio de entrega do DNA não viral mais utilizados, contudo são constituídos por genes necessários para a produção e replicação nos respectivos hospedeiros que quando administrados em humanos podem causar respostas inflamatórias e imunitárias. Neste contexto, surge o DNA minicircular (mcDNA) como uma tecnologia altamente promissora visto que é constituído unicamente pelos genes de expressão eucariota, necessários para a expressão do gene terapêutico. O mcDNA é por isso considerado um vetor de DNA mais seguro e está associado a um elevado efeito terapêutico, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias eficientes para a sua purificação.

Neste projeto foi usada a cromatografia de afinidade com derivados de aminoácidos (agmatina e histamina) como ligandos, para estabelecer um método eficaz de purificação do mcDNA. Para o alcance dos melhores resultados possíveis quando aplicada cromatografia de afinidade é essencial um conhecimento minucioso do tipo de interações que se estabelecem entre a amostra injetada e os derivados de aminoácidos estudados. Neste estudo, verificou-se que para o caso da agmatina estabelecem-se maioritariamente interações eletrostáticas para valores de pH inferiores ao pKa e que estas são intensificadas com a diminuição do pH. Observou-se também uma preferência por parte do monolito para a isoforma sc provavelmente devido à maior exposição das bases que assim permite que se intensifiquem outras interações como interações catião- π e interações por pontes de hidrogénio entre as aminas da agmatina e preferencialmente as guaninas da isoforma sc do mcDNA. Relativamente à histamina, apesar de não se ter conseguido estabelecer uma estratégia de purificação, foi também estudado um possível bioreconhecimento do mcDNA para com este derivado de aminoácido. E observou-se que quando utilizado NaCl há também uma preferência por interações eletrostáticas quando aplicados valores de pH inferiores ao pKa, pois assim o ligando apresenta uma carga global positiva que, por conseguinte, interage fortemente com a carga negativa do DNA conferida pelos grupos fosfato. Relativamente à estratégia de eluição com recurso a sulfato de amónio não foi concretizável visto que não se conseguiu obter seletividade, no entanto esta estratégia é menos interessante do ponto de vista industrial dada a implicação ambiental negativa associada ao sulfato de amónio.

Após o estudo das diversas condições definiu-se que o suporte mais promissor para a purificação do mcDNA era o monolito modificado com agmatina, usando como gradiente a estratégia por passos com as seguintes concentrações de NaCl: 0 M, 1,5 M, 2,25 M e 2,7 M em 10 mM de tampão

Tris-HCl. A biomolécula de interesse eluiu a 2,7 M de NaCl, no entanto verificou-se uma grande perda desta nos passos anteriores. Contudo, neste tipo de estudo, por vezes é necessário comprometer a recuperação de modo a conseguir a pureza adequada. Desta forma, a estratégia desenvolvida neste trabalho permitiu uma separação eficaz da isoforma sc do mcDNA, embora se tenha comprometido parte da biomolécula de interesse nos passos iniciais.

De uma forma sucinta, a utilização do suporte monolítico modificado com agmatina pode ser uma solução para a purificação da isoforma sc do mcDNA para uma posterior aplicação terapêutica.

Palavras-chave

Agmatina; Cromatografia de afinidade; DNA minicircular; Histamina; Plasmídeo Parental.

Abstract

Currently, there are several diseases that deeply affect society, and the available therapies are not adequate, victimizing part of the population. Gene therapy and DNA vaccines are a promising alternative aiming the DNA administration allowing the organism to express a given protein / information necessary to contour the disease. The plasmids have been the most used nonviral DNA delivery system, however these have some sequences required for production in bacteria that, when administrated in humans may cause inflammatory and immune responses. In this context, minicircle (mcDNA) arises as a highly promising technology given that it is solely composed by recombinant eukaryotic gene expression, which is necessary to the expression of the therapeutic gene. The mcDNA is therefore considered a safer vector of DNA and it is associated with a high therapeutic effect, being necessary the development of efficient methodologies for mcDNA purification.

In this project, the affinity chromatography was used, exploiting the application of amino acids derivatives as ligands, to establish a suitable method for mcDNA purification. To have the best results when affinity chromatography is applied it is essential to know the kind of interactions established between the injected sample and the studied derivatives amino acids. In the present study it was concluded that in the case of agmatine there are mainly favored electrostatic interactions with the phosphate groups of the DNA to values of pH lower than pKa and that they are intensified with the decreasing of pH. It was also observed a greater interaction between the agmatine immobilized on the monolith and the supercoiled (sc) isoform probably due to the higher exposure of the bases that allow the occurrence of other interactions, like cation- π and interactions by hydrogen bonds between the amines of agmatine and preferentially the guanines of the sc isoform of mcDNA. Relatively to histamine, despite not having been able so establish a purification strategy, it was also studied a possible biorecognition of mcDNA with this amino acid derivative. It was also observed that when NaCl is used, electrostatic interactions are also prevalent when pH values lower than pKa are applied, because in these conditions the ligand presents a global positive charge and consequently, interact strongly with the negative charge provided by the phosphate groups. Relatively to the elution strategy with ammonium sulfate, purification was not achieved since it was not possible to obtain the required selectivity. However, this strategy is less interesting from an industrial point of view due to the negative environmental implications associated with ammonium sulfate.

After this study it was defined that the best support to be used in mcDNA purification was agmatine-monolith, using an elution gradient based on a stepwise gradient with four steps as follows: 0 M NaCl, 1.5 M NaCl, 2.25 M NaCl and 2.7 M in 10 mM of Tris-HCl buffer, pH 6. The biomolecule of interest was eluted at 2,7 M NaCl, however there was a large loss of mcDNA in

previous steps. Nevertheless, in this kind of study, sometimes it is necessary to compromise the recovery in order to achieve the desired purity.

Briefly, the application of the monolithic support modified with agmatine can be a solution to the purification of the isoform sc of mcDNA to a therapeutic application.

Keywords

Affinity chromatography; Agmatine; Histamine; Minicircle DNA; Parental Plasmid.

Índice

CAPÍTULO 1 - Introdução	1
1.1. Terapias baseadas em DNA	1
1.1.1. Terapia génica	1
1.1.2. Vacinas de DNA	3
1.1.3. Sistemas de Entrega	6
1.1.3.1. Vetores virais.....	6
1.1.3.2. Vetores Não Virais.....	8
1.1.3.2.1. Métodos físicos de entrada do DNA	10
1.1.3.2.2. Métodos químicos de entrada do DNA	10
1.2. DNA plasmídico	11
1.2.1. Processo <i>Upstream</i> - Construção e produção do plasmídeo	13
1.2.2. Processo <i>Downstream</i> - Isolamento do plasmídeo	14
1.2.2.1. Purificação do pDNA	16
1.2.2.1.1. Cromatografia de exclusão molecular	17
1.2.2.1.2. Cromatografia de troca aniónica	17
1.2.2.1.3. Cromatografia de interação hidrofóbica	18
1.2.2.1.4. Cromatografia de afinidade	18
1.2.2.1.5. Agmatina e Histamina - ligandos para cromatografia de Afinidade	19
1.2.2.2. Suportes Monolíticos	20
1.3. DNA minicircular	21
1.3.1. Produção e estrutura do mcDNA	22
1.3.2. Estratégias de purificação do mcDNA	23
CAPÍTULO 2 - Objetivos	25
CAPÍTULO 3 - Materiais e Métodos	27
3.1. Materiais	27
3.2. Métodos	27
3.2.1. Condições de crescimento bacteriano e Produção do PP	27
3.2.2. Síntese do mcDNA	28
3.2.3. Digestão Enzimática.....	28

3.2.4.	Recuperação do mcDNA	28
3.2.4.1.	Lise alcalina com o Kit da Qiagen	28
3.2.5.	Purificação do mcDNA	29
3.2.5.1.	Cromatografia de Afinidade	29
3.2.5.2.	Eletroforese em gel de agarose.....	29
CAPÍTULO 4 - Resultados e discussão		31
4.1.	Produção do mcDNA	32
4.2.	Extração do mcDNA	34
4.4.	Estratégias de Purificação	40
4.4.1.	Monolito de histamina para a purificação de mcDNA	40
4.4.2.	Monolito de agmatina para a purificação de mcDNA.....	43
4.4.2.1.	Monolito de agmatina para a purificação de mcDNA Small	50
CAPÍTULO 5 - Conclusões e perspectivas futuras.....		53
Referências Bibliográficas.....		57

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação gráfica das principais áreas de estudo para aplicação da terapia génica.	2
Figura 2 - Princípio da terapia génica.	3
Figura 3 - Esquema de atuação das vacinas de DNA.	4
Figura 4 - Representação gráfica da utilização dos diversos tipos de vetores, virais e não-virais.	9
Figura 5 - Esquematização de DNA genómico e de um plasmídeo, onde se podem observar as principais regiões integrantes do pDNA.	12
Figura 6 - Plataforma biotecnológica de produção de pDNA.	16
Figura 7 - Composição dos derivados de aminoácidos imobilizados nos discos monolíticos: A- Agmatina, B - Histamina.	20
Figura 8 - Esquematização do processo de produção de mcDNA.	23
Figura 9 - Curva de crescimento da <i>E. coli</i> transformada com o plasmídeo de interesse.	33
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas da lise alcalina e pré-purificação utilizando o Kit da Qiagen.	36
Figura 11 - Mapa do PP que origina o mcDNA.	37
Figura 12 - Esquema representativo da ação das enzimas de restrição Nde I, BamH I e EcoR I no PP.	38
Figura 13 - . Esquema da ação das enzimas de restrição Nde I, BamH I e EcoR I no mcDNA. ...	39
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas nas digestões enzimáticas.	39
Figura 15 - Eletroforese de agarose com a análise das frações recolhidas dos picos obtidos no ensaio relativo à injeção de uma amostra contendo mcDNA no monolito de histamina.	42
Figura 16 - Perfis cromatográficos obtidos após injeção da amostra contendo mcDNA no suporte de agmatina, usando o tampão 10 mM Tris-HCl a pH 6, 7 e 8.	44
Figura 17 - Eletroforese representativa das espécies eluídas nos ensaios de pH, representados nos cromatogramas da figura 16.	45
Figura 18 - Cromatograma representativo do estudo efetuado com o monolito de agmatina.	47
Figura 19 - (A) Cromatograma representativo do estudo efetuado com o monolito de agmatina. (B) Eletroforese em gel de agarose representativa do cromatograma observado.	49
Figura 20 - (A) Cromatograma representativo do estudo efetuado com o monolito de agmatina. Foi aplicado um gradiente por passos, usando concentrações crescentes de NaCl de 0 M, 1,5 M, 2,25 M e 2,7 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl. (B) Eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas do ensaio descrito.	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens da utilização das vacinas de DNA.	5
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos diversos tipos de vírus utilizados como vetores para entrega de material genético.....	8
Tabela 3 - Condições estabelecidas pelas agências reguladoras relativamente à presença de contaminantes de plasmídeo resultantes da plataforma biotecnológica.	15
Tabela 4 - Propriedades físicas, químicas e estruturais similares para o pDNA e as restantes biomoléculas.....	17
Tabela 5 - Resumo do comportamento de ligação/eluição das isoformas de mcDNA presentes na amostra.	48

Lista de Acrónimos

µg	Micrograma
µL	Microlitro
°C	Celsius
APCs	Células apresentadoras de antigénios
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EU	Unidades de Endotoxinas
FDA	“Food and Drug Administration”
g	Gramma
Gdna	DNA genómico
GFP	Gene Repórter da proteína fluorescente verde
HCl	Ácido Clorídrico
IMAC	Cromatografia de Afinidade com Iões Metálicos Imobilizados
kpb	Quilo pares de bases
L	Litro
LB	“Luria-Bertani”
M	Molar
mA	Miliamperes
mcDNA	DNA minicircular
mcDNA Small	DNA minicircular sem o gene GFP
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanómetro
oc	Circular Aberto
pDNA	DNA plasmídico

PP	Plasmídeo Parental
PP Small	Plasmídeo Parental sem o gene GFP
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
sc	Superenrolada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
TAE	Tris, ácido acético EDTA
TB	“Terrific Broth”
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
w/v	massa/volume

CAPÍTULO 1 - Introdução

1.1. Terapias baseadas em DNA

As terapias baseadas na administração de DNA têm vindo a ganhar um impacto crescente no decorrer dos últimos anos, dada a sua aplicabilidade em diversos tipos de doenças consideradas incuráveis, tais como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), Cancro e Doenças Neurológicas e Cardiovasculares. Comparativamente aos fármacos convencionais, estes bioprodutos têm a vantagem de ser muito mais seletivos [1,2] e seguros [3].

Esta estratégia terapêutica sofreu um maior desenvolvimento após a descodificação do genoma humano em 2001, altura em que se alcançou um conhecimento muito mais pormenorizado no que concerne à identificação de genes e produtos de expressão, que permite o estabelecimento de uma relação entre genes e patologias. Este conhecimento possibilitou a implementação de um espectro de aplicações bastante mais abrangente para esta modalidade terapêutica [4].

Neste contexto, surgiram duas abordagens terapêuticas com recurso à aplicação de DNA: a terapia génica e as vacinas de DNA. No que respeita à primeira, através da reposição de determinados genes é possível induzir a expressão de proteínas, potenciais corretoras de uma deficiência associada a uma patologia [5], ao passo que as vacinas de DNA estimulam a resposta imune através da entrega de genes que codificam antigénios de agentes patogénicos específicos [1].

1.1.1. Terapia génica

O conceito de terapia génica foi abordado pela primeira vez no sexto congresso de Genética, em Ítaca, em 1932. Desde então foram desenvolvidos inúmeros estudos sobre esta temática, mas a sua aplicabilidade em humanos só foi testada na década de 80 [5]. A terapia génica tem suscitado um interesse crescente, dado o seu potencial de utilização no tratamento de diversas doenças, muitas das quais consideradas incuráveis. As doenças oncológicas, as cardiovasculares, as infecciosas como a SIDA e as doenças monogénicas de cariz hereditário constituem algumas das patologias mais estudadas no âmbito deste conceito terapêutico emergente [2,6,7]. A figura 1 representa as principais áreas terapêuticas em estudo, baseadas em terapia génica.

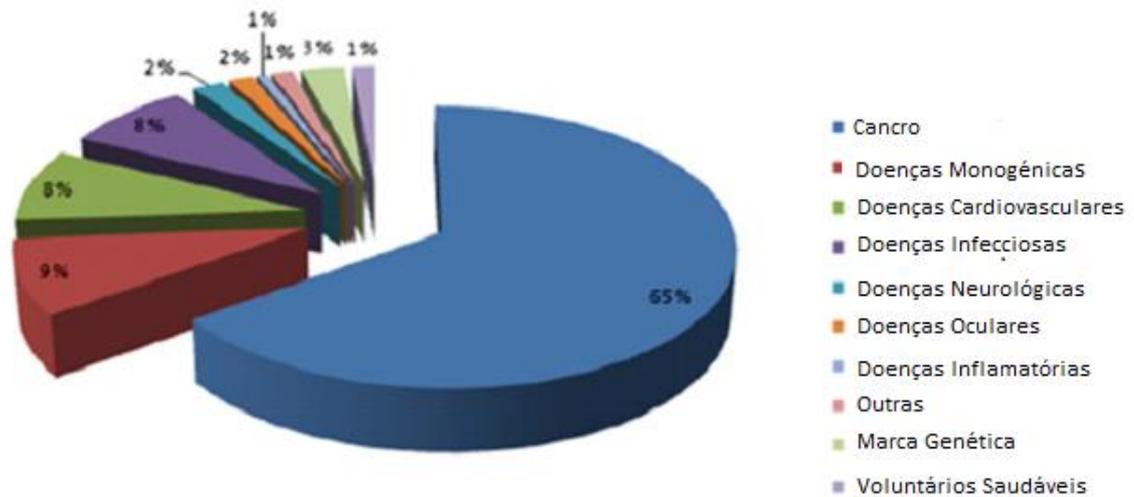


Figura 1 - Representação gráfica das principais áreas de estudo para aplicação da terapia génica. A terapia de cancro é a área com maior destaque tendo uma representação superior a 50% (adaptado de [7]).

Dado que se trata de uma terapia que visa a manipulação genética, são levantadas muitas questões éticas, assim como preocupações relacionadas com a segurança e possíveis efeitos secundários no paciente. Deste facto se depreende que seja de extrema importância um controlo por parte das agências reguladoras. Atualmente, a legislação apenas permite que a terapia génica seja dirigida às células somáticas [7], mas considerando que as perspectivas futuras são de um impacto crescente no tratamento de um maior número de patologias [2], antevê-se que esta área seja alvo de várias atualizações, no que se refere às normas estabelecidas por estas agências.

Esta abordagem terapêutica representa uma alternativa viável aos métodos convencionais, uma vez que é considerada mais económica, tem alta especificidade e permite um tempo de atuação prolongado. Estes fatores vão permitir uma resposta menos agressiva por parte do hospedeiro e um direcionamento mais eficaz para as células alvo. Assim sendo, prevê-se que no futuro a terapia génica seja cada vez mais aplicada, de forma isolada ou em conjugação com as terapias estabelecidas, para o tratamento de doenças humanas [2].

O princípio da terapia génica passa pela introdução de material genético nas células, para que seja expresso e resulte no desenvolvimento de determinadas características na célula. Para tal, estes genes terapêuticos são direcionados à célula alvo com recurso a sistemas de entrega. De seguida, ocorre a sua entrada no interior da célula, onde depois são incorporados no material genético do hospedeiro. Para garantir um efeito terapêutico por um período de tempo mais prolongado, deve assegurar-se que o gene terapêutico permanece no interior do núcleo da célula. Deste modo, a célula poderá expressar uma nova informação genética e sintetizar uma proteína, reestabelecendo a homeostasia celular e do organismo [5,8,9]. A figura 2 esquematiza o processo geral da terapia génica. No entanto, é importante realçar que para além do DNA, a célula pode incorporar outros componentes, nomeadamente o RNA [3].

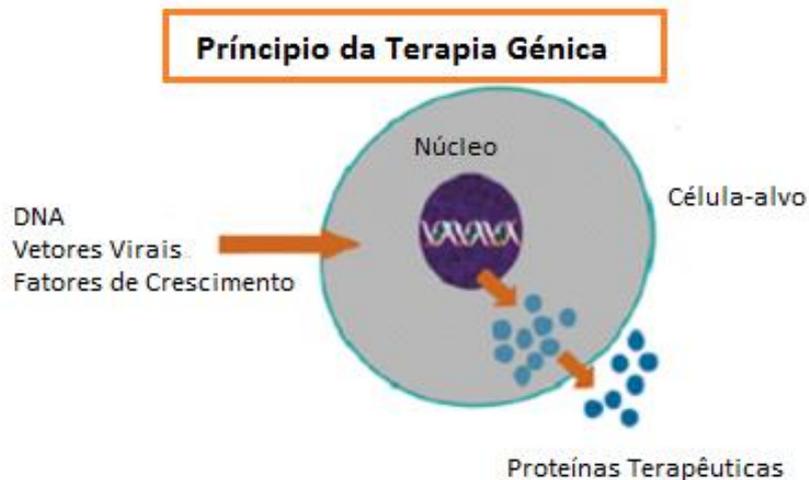


Figura 2 - Princípio da terapia génica. A terapia génica baseia-se na incorporação de DNA que contém informação para a codificação de uma proteína terapêutica, no ambiente celular (adaptado de [8]).

1.1.2. Vacinas de DNA

Desde que Edward Jenner abordou, pela primeira vez, o conceito de prevenção, a medicina ganhou uma nova perspetiva. Esta nova abordagem permitiu o desenvolvimento de estudos relacionados com a vacinação, sendo estes marcados por um equilíbrio entre fases de estagnação e progresso [10]. As vacinas convencionais, atualmente comercializadas, englobam agentes patogénicos mortos ou vírus atenuados. Contudo, estas vacinas não constituem ainda uma barreira imunológica suficiente para atender às necessidades da sociedade atual, dado que todos os anos, doenças como a malária, o cancro, a SIDA, a tuberculose, entre outras, atingem muitas vítimas por todo o mundo [11,12]. Deste modo, a Biotecnologia em constante evolução, desenvolveu um novo conceito, as vacinas de DNA, que se revelaram uma potencial solução face a esta problemática [10].

As vacinas de DNA foram abordadas, pela primeira vez, em meados do século XX [7], sendo desenvolvidas com o intuito de desencadear uma forte e duradoura resposta imune celular e humoral [13]. Os genes administrados codificam antígenos de agentes patogénicos específicos [14]. Uma das principais diferenças das vacinas de DNA relativamente às convencionais, é a sua capacidade para transportar regiões altamente conservadas, o que permite um combate mais eficaz contra agentes patogénicos que tenham sofrido alterações, como o HIV e o vírus influenza [10].

A administração das vacinas de DNA pode ser intramuscular, subcutânea ou oral, de modo a que o material genético consiga aceder às células alvo [15]. Após a administração, ocorre a transfeção, processo pelo qual as células do organismo incorporam o material genético no núcleo e começam a expressar os antígenos alvo. Estas células podem ser somáticas (como por exemplo, miócitos ou queratinócitos) ou células apresentadoras de antígenos (APCs). Estas

células, ao deslocarem-se no sistema linfático vão encontrar as células citotóxicas (células T CD8⁺) que reconhecem o antígeno exposto no complexo de histocompatibilidade I pelas APCs. Este processo leva à ativação das células T CD8⁺, as quais constituem uma importante barreira no controlo de infeções, visto que têm a capacidade de eliminar as células infetadas. No que respeita às células somáticas transfetadas, estas têm a capacidade de secretar o antígeno adquirido, o qual será reconhecido pelas células T auxiliares (células T CD4⁺) no complexo de histocompatibilidade II. Por sua vez, este processo leva à ativação das células B que vão induzir a produção de anticorpos, permitindo assim uma resposta mais eficaz numa infeção posterior. É ainda importante denotar, que no início do processo as células somáticas podem sofrer apoptose. Neste caso, os antígenos constituintes das células apoptóticas e os antígenos libertados durante a morte celular programada são incorporados pelas APCs, passando a seguir-se a via do complexo de histocompatibilidade I [12,16]. Todo este processo pode ser observado mais pormenorizadamente na figura 3.

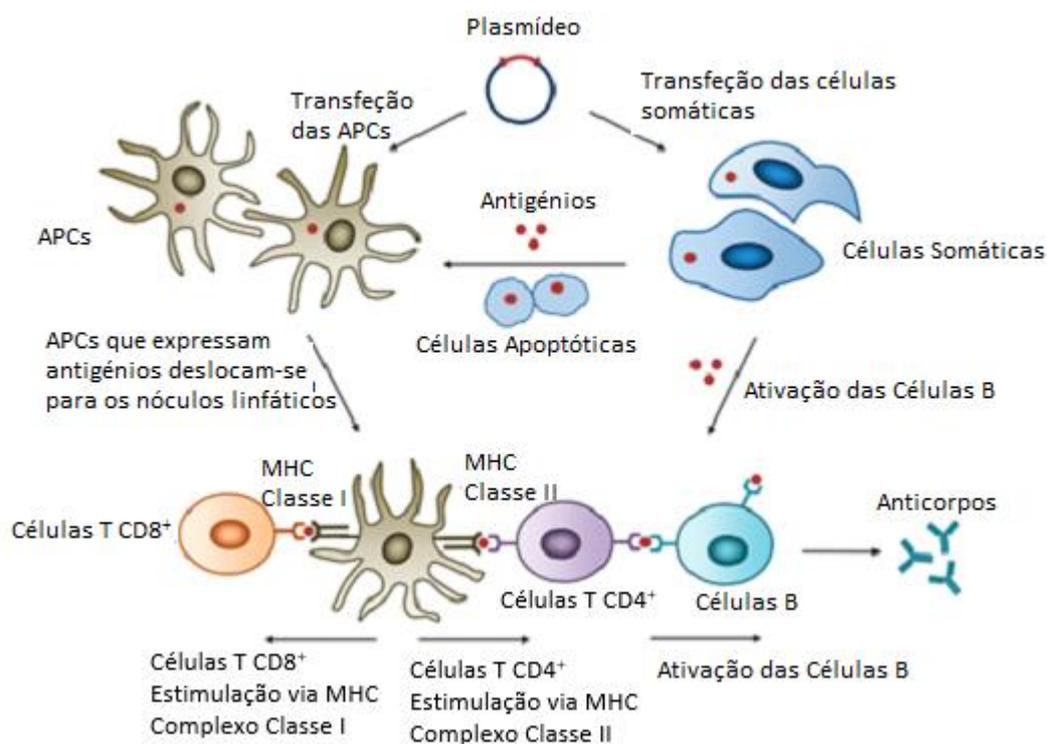


Figura 3 - Esquema de atuação das vacinas de DNA. Neste esquema pode observar-se a via do complexo de histocompatibilidade I que leva à ativação das células T CD8⁺, que têm uma importante função no controlo de infeções. Pode também observar-se a via do complexo de histocompatibilidade II, da qual resulta a produção de anticorpos (adaptado de [16]).

Os estudos referentes às vacinas de DNA têm-se revelado cada vez mais promissores, demonstrando diversas vantagens destas vacinas relativamente às convencionais, nomeadamente uma maior segurança, facilidade de produção e maior especificidade. As vacinas de DNA levantam menos obstáculos, uma vez que não existe o risco de reversão do vírus que poderia desencadear uma infeção [14,16]. Para além disso, estudos em animais revelaram que no caso das vacinas de DNA, há um risco muito menor de formação de anticorpos contra os

que foram previamente formados devido à ação da vacina [10]. Contudo, existem algumas desvantagens associadas a este tipo de vacinas, tais como baixa imunogenicidade e baixa eficiência de transfeção. Dado que se trata de um produto que visa a sua aplicação em humanos, é essencial considerar todas as questões relacionadas com a segurança. As vantagens e desvantagens associadas a este tipo de terapia podem ser observadas mais minuciosamente na Tabela 1.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens da utilização das vacinas de DNA (adaptado de [16,17]).

Vantagens	Desvantagens
Processo de produção relativamente rápido e barato	Inserção de DNA com potencial ocorrência de algumas modificações celulares
Facilidade de armazenamento e transporte	Risco de produção de anticorpos contra o DNA administrado
Possibilidade de uma ação prolongada	Possibilidade de existência de uma baixa imunogenicidade
Possibilidade de utilização de uma mistura de plasmídeos permitindo um maior campo de aplicação	Baixa eficiência de transfeção ou expressão insuficiente do antígeno
Indução de uma resposta imune semelhante à das vacinas com o vírus atenuado	
Inexistência de risco de retorno para as formas virulentas	
Foco da resposta imune apenas no antígeno pretendido	

Prevê-se que futuramente se realizem estudos ainda mais exaustivos, de modo que estas vacinas se possam impor como uma estratégia viável de aplicabilidade em humanos, no combate a várias doenças infecciosas. Estas otimizações podem passar por uma nova seleção de antígenos, do vetor, do modo de administração e/ou do sistema de entrega [17]. A utilização de adjuvantes tem-se revelado também uma opção bastante explorada, de forma a aumentar a eficiência, sendo as citocinas [15], a interleucina-2 [14], a vaxfectina [17], as enterotoxinas termolábeis [16], exemplos bastante estudados. Todas estas melhorias visam a amplificação da resposta imune induzida pela aplicação da vacina de DNA. Espera-se que os estudos relativos a esta modalidade terapêutica continuem a ter um desenvolvimento positivo, de modo a que, futuramente, possa ser aplicada no combate a doenças que têm suscitado uma inquietação crescente na sociedade atual.

1.1.3. Sistemas de Entrega

O máximo sucesso da terapia génica e das vacinas de DNA depende da entrega do material genético à célula-alvo, de forma eficiente [18,19]. Os sistemas de entrega representam assim, uma opção altamente seletiva e eficaz para transportar o DNA à célula alvo [18], protegendo-o de degradação e facilitando o percurso até ao núcleo das células [5]. Ao longo deste percurso, vários obstáculos podem surgir, quer associados ao transporte até à célula, quer no percurso no interior da célula até atingir o núcleo, o que limita a eficácia da estratégia terapêutica. As principais dificuldades a ultrapassar passam pela captação ineficiente do DNA transportado, pela libertação inadequada do DNA no interior da célula ou pelo direcionamento incorreto do DNA para o núcleo [19]. Para além de protegerem e facilitarem a entrega do DNA, os sistemas de entrega devem igualmente garantir que o DNA permaneça no organismo pelo período de tempo necessário à sua função [20].

De modo a garantir a máxima eficiência, o sistema de entrega deve cumprir os seguintes pré-requisitos: dispor de dimensões que permitam a passagem pela membrana celular e entrada no núcleo; ausência de interações com células vasculares e endoteliais; e capacidade de evitar a captura por parte do sistema reticuloendotelial [5]. Considera-se também que um dos fatores essenciais a ter em consideração no que respeita aos vetores utilizados é o direcionamento, isto é, deve garantir-se que estes sistemas conseguem contornar barreiras biológicas e deslocar-se unicamente para as células-alvo. Caso ocorra transfeção em células não alvo, há um risco acrescido de efeitos adversos [21].

No que concerne à sua classificação, os vetores podem ser divididos em duas categorias: virais e não virais, sendo que ambos apresentam vantagens e desvantagens. Relativamente aos vetores virais, existem algumas preocupações relacionadas com a segurança que comprometem a sua utilização global. Estas preocupações tornaram os vetores não virais uma opção mais atrativa à investigação atualmente em curso [5,19,20].

1.1.3.1. Vetores virais

A tentativa pioneira de aplicação de um vetor viral foi realizada em 1973, tendo sido utilizado o Vírus do Papiloma Shope, contudo o sucesso pretendido não foi alcançado [21]. Desde então, inúmeros estudos foram desenvolvidos, e presentemente, os vetores virais são considerados uma das formas de entrega de DNA mais eficiente e segura [20].

O vírus é um agente com capacidade de transferência parcial do seu material genético para a célula hospedeira, induzindo a expressão de nova informação na célula. Esta capacidade pode ser explorada no âmbito da terapia génica, através da substituição de genes não essenciais do vírus por genes terapêuticos. É importante denotar que os genes responsáveis pela infecciosidade devem ser previamente eliminados [21].

Existem diversos tipos de vírus que podem ser utilizados como vetores, sendo os mais comuns os adenovírus, os retrovírus, os vírus adeno-associados e os vírus derivados do herpes, descritos aqui por ordem decrescente de utilização, de acordo com os dados da figura 4 [20]. Os adenovírus e os vírus derivados do herpes promovem reduzidos tempos de expressão ao passo que, os vírus adeno-associados e os retrovírus induzem uma resposta mais prolongada.

Relativamente aos mais utilizados, os adenovírus, estes são constituídos por uma cadeia dupla de DNA [21] e o seu genoma não integra no da célula que está a ser infetada [22], o que desencadeia um tempo de expressão menor [21]. As principais vantagens estão associadas a uma eficiente distribuição e expressão, além de proporcionarem o transporte de uma quantidade razoável de DNA [23,24]. Contudo, os adenovírus detêm altos níveis de toxicidade e imunogenicidade intrínsecos, fatores críticos que muitas vezes impossibilitam a sua aplicação [22].

Por sua vez, os retrovírus são constituídos por uma cadeia simples de RNA [20] e são integrativos, isto é, o seu material genético vai ser incorporado no da célula hospedeira, como parte do seu ciclo celular [21]. Este tipo de vetor é considerado uma alternativa viável, visto que tem a capacidade de promover e manter a expressão dos genes transfetados por um longo período de tempo [25]. Para além disso, têm uma baixa imunogenicidade associada e a sua construção é relativamente fácil. Como desvantagens são normalmente referidas a baixa estabilidade e elevado risco de mutagenese [24].

No que respeita aos vírus adeno-associados, estes são constituídos por uma cadeia simples de DNA [20] e permitem um tempo de expressão prolongado [21], determinado pela sua natureza integrativa. Este tipo de vetor é pouco imunogénico, todavia não consegue transportar grandes quantidades de DNA [24].

Por último, os vírus derivados do herpes promovem um tempo de expressão reduzido, [21] uma vez que apresentam um carácter não integrativo. Estes vetores conseguem transportar grandes quantidades de DNA e são muito utilizados particularmente em contexto de terapia oncológica, podendo, no entanto, estar associados ao desenvolvimento de respostas tóxicas e/ou imunes [24]. Na tabela 2 são apresentadas as vantagens e desvantagens dos tipos de vírus anteriormente descritos.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos diversos tipos de vírus utilizados como vetores para entrega de material genético (adaptado [24]).

Tipo de Vírus	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Transduz tanto as células que se encontram em divisão, como as que não se encontram ➤ Consegue transportar mais de 8 Kpb de DNA ➤ Permite altos níveis de expressão ➤ É rapidamente produzido 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Apresenta alta imunogenicidade ➤ O vetor não é integrado no genoma da célula hospedeira
Retrovírus	<ul style="list-style-type: none"> ➤ O vetor integra o genoma da célula hospedeira ➤ Consegue transportar mais de 8 Kpb de DNA ➤ É pouco imunogénico ➤ Consegue infetar diversos tipos de tecidos ➤ É de fácil construção ➤ É rapidamente produzido 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Transduz somente células replicativas ➤ Atinge com alguma dificuldade o direcionamento ➤ Exibe alto risco de inserção e mutagénese ➤ Apresenta uma baixa estabilidade associada
Vírus Adeno-Associados	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Transduz tanto as células que se encontram em divisão, como as que não se encontram ➤ Consegue infetar diversos tipos de tecidos ➤ É pouco imunogénico 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ É necessária uma coinfeção por outro vírus (adenovírus ou vírus do herpes) ➤ Transporta escassas quantidades de DNA
Vírus derivado do Herpes	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Consegue infetar diversos tipos de tecidos ➤ Consegue transportar mais de 50 Kpb de DNA ➤ É rapidamente produzido 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Apresenta cito toxicidade residual ➤ O vetor não é integrado no genoma da célula hospedeira

1.1.3.2. Vetores Não Virais

Considerando as questões de segurança suscitadas pelos vetores virais, surgiram os vetores não virais como uma alternativa mais promissora para a entrega de material genético [2,9,18]. Estes

sistemas de entrega inovadores são vantajosos, uma vez que a sua aplicação é considerada uma das mais seguras [3], sendo relativamente simples e possibilitando a sua produção em larga escala. Para além disso, a utilização deste tipo de vetores não é comprometida por respostas imunes específicas [18]. Outros inconvenientes associados ao sistema de entrega viral que são contornados pelo sistema não viral prendem-se com a capacidade de transporte de maior quantidade de DNA [9], possibilidade de administração repetida sem implicar uma resposta imune subsequente e viabilidade de aplicação a nível tópico [2,26].

Englobados nesta classe de sistemas de entrega, existem três tipos de vetores que se destacam: os plasmídeos, os cosmídeos e os cromossomas artificiais [3]. Dos referidos anteriormente, o DNA plasmídico (pDNA) é o mais utilizado e inúmeros estudos têm sido desenvolvidos com recurso a esta tecnologia inovadora [27-32].

Como discutido anteriormente, a entrada dos vetores nas células alvo pode ser limitada, e estes devem ultrapassar diversos obstáculos para poderem exercer a sua função biológica. Como tal, foram desenvolvidos diferentes métodos, que abrangem o uso de materiais sintéticos e naturais, ou com recurso a forças físicas, [33] que facilitam o acesso do material genético à célula, proporcionando maiores taxas de sucesso [19].

Na figura 4, estão representados os diversos vetores existentes, virais e não virais, assim como a proporção relativa da sua aplicação.

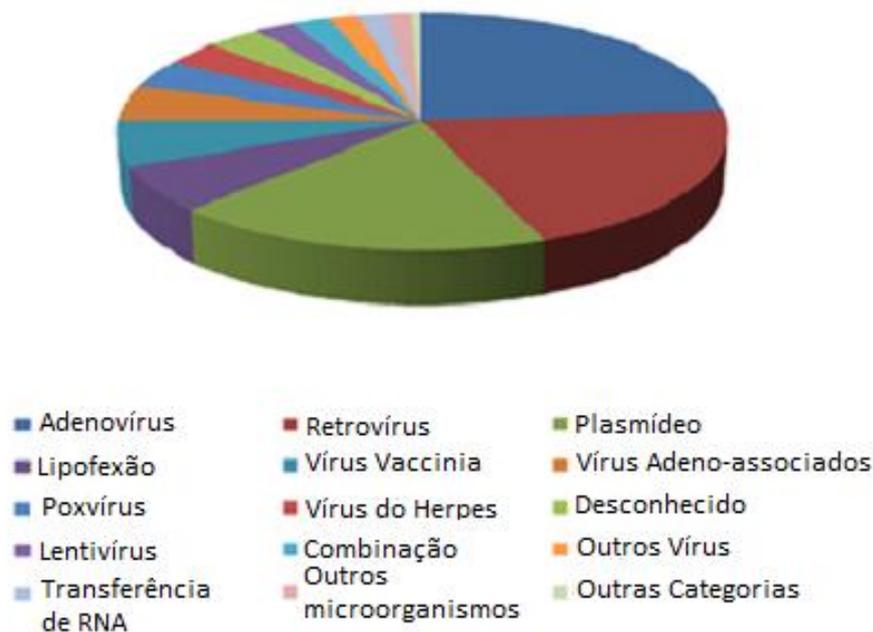


Figura 4 - Representação gráfica da utilização dos diversos tipos de vetores, virais e não-virais. Em constatação, as partículas virais (adenovírus e retrovírus) constituem o tipo de vetor mais utilizado, seguidas do pDNA que representa o terceiro tipo de vetor mais utilizado (adaptado de [36]).

1.1.3.2.1. Métodos físicos de entrada do DNA

Para que a tecnologia baseada em terapias com utilização do DNA seja viável como ponto de partida para a concretização de determinadas terapêuticas como a terapia génica e as vacinas de DNA, é essencial garantir que a molécula tenha acesso ao interior da célula alvo. Contudo, esta realidade nem sempre é exequível, dada a natureza do DNA, da célula alvo e dos obstáculos extracelulares [18,20].

Tendo em conta a problemática exposta, surgiram os métodos físicos que, com recurso a determinadas forças, são usados para facilitar o acesso do material transportado ao interior das células [5,33]. Estas técnicas incluem a injeção direta, a eletroporação, ultrassons, a injeção hidrodinâmica e a injeção balística de DNA [1,33].

A injeção direta é o método mais simples e foi aplicado pela primeira vez em 1990, intramuscularmente. Esta técnica baseia-se na injeção direta do DNA e destaca-se por ser um método relativamente simples e potenciar um baixo nível de toxicidade. O material genético administrado permanece essencialmente restrito à área de injeção, limitando a expressão génica a esse local [33,34]. Relativamente à eletroporação, esta foi aplicada pela primeira vez *in vitro* e *in vivo* em 1982 e 1991, respetivamente [33]. Esta técnica consiste na aplicação de uma série de impulsos elétricos, curtos e intensos, que vão promover uma destabilização da membrana da célula alvo favorecendo um aumento da sua permeabilidade, o que facilita a entrada do DNA [1,34]. A aplicação desta abordagem *in vivo* é considerada relativamente segura, eficiente e reprodutível. [5,33]. Em relação aos ultrassons, em 1954 colocou-se, pela primeira vez, a hipótese de utilizar os mesmos no contexto da entrega de material genético [33], mas é uma técnica que não tem sido largamente explorada [34]. Esta metodologia consiste na aplicação de ondas de ultrassons que promovem a formação de poros na membrana celular, permitindo a entrada do DNA. No que diz respeito à injeção hidrodinâmica, esta foi aplicada pela primeira vez em 1996, e consiste na injeção a alta velocidade e num curto período de tempo (entre 3 a 5 segundos) de uma grande quantidade de solução de DNA. [5]. Relativamente à injeção balística de DNA, a mesma foi aplicada pela primeira vez em 1987, para introduzir genes em plantas [19]. São utilizadas partículas revestidas de ouro, tungsténio ou prata impulsionadas por um gás inerte pressurizado, [33] havendo um encaminhamento direto para as células [34].

1.1.3.2.2. Métodos químicos de entrada do DNA

Para além dos métodos físicos que facilitam a entrada de DNA no interior das células alvo, existem também os métodos químicos que se baseiam na utilização de materiais de origem sintética ou natural [33]. Estes métodos recorrem à criação de sistemas de entrega conjugando o DNA com lípidos catiónicos, polímeros catiónicos ou nanopartículas inorgânicas, que vão conferir maior proteção ao material transportado [1,18,20,33,34]. De uma forma mais simplista, pode afirmar-se que estes compostos formam um complexo com as moléculas de

DNA, permitindo uma redução de tamanho e ajuste da carga, o que teoricamente permite maior eficiência de entrega [34].

Em 1987, foi descrito o primeiro caso de sucesso de aplicação de lípidos catiónicos *in vitro*. Estas moléculas são sintéticas [18] e são caracterizadas pela sua carga global positiva, e apresentação de uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. A parte hidrofílica é constituída maioritariamente por amins primárias, secundárias e terciárias, que são responsáveis pelo carácter positivo dos lípidos e permitem o estabelecimento de interações eletrostáticas com o DNA terapêutico cuja carga negativa é conferida pelos grupos fosfato. Estas interações proporcionam a formação de lipoplexos, onde o DNA poderá estar compactado no interior, numa zona carregada negativamente, rodeado pelos lípidos carregados positivamente [1,20,33,34].

Relativamente aos polímeros catiónicos, estes têm a capacidade de estabelecer ligações com o DNA também por via de interações eletrostáticas. À semelhança do caso anterior, o poliplexo positivo formado vai interagir com as moléculas carregadas negativamente das células alvo, permitindo, desta forma, a entrada do DNA nas mesmas. [1,18]. Este método tem a vantagem de ser mais barato [1] e eficiente relativamente à utilização de lípidos catiónicos [18], visto que os poliplexos conseguem escapar mais facilmente dos endossomas [33]. Apesar desta vantagem, apresentam ainda baixa capacidade de transfeção e alguns polímeros possuem algumas propriedades farmacológicas que podem não ser compatíveis com uma administração em humanos [1].

As nanopartículas inorgânicas são preparadas a partir de metais como o ferro, o ouro e a prata. A superfície metálica destas estruturas vai interagir com o DNA, originando-se partículas de pequeno tamanho. O facto de possuírem dimensões reduzidas é muito vantajoso, uma vez que conseguem atravessar com maior facilidade a membrana celular e têm a capacidade de escapar mais facilmente a barreiras fisiológicas e celulares [33].

Atualmente, apesar do potencial terapêutico em expansão das abordagens supracitadas, estas ainda se encontram em investigação, uma vez que apresentam, na sua generalidade, baixas taxas de transfeção. Contudo, é de esperar que futuros estudos mais exaustivos sejam realizados no sentido da sua aplicação em humanos, com um elevado sucesso e com um reduzido número de efeitos secundários [1,18,20,33,34].

1.2. DNA plasmídico

A utilização do pDNA como vetor de entrega de genes terapêuticos é uma estratégia muito atrativa para aplicação em terapia génica e vacinas de DNA [2,28,31]. Nas últimas duas décadas desenvolveram-se inúmeros estudos, de modo a que a implementação deste sistema de entrega num contexto clínico se torne uma realidade tangível [29,35], uma vez que este vetor não viral é caracterizado por possibilitar uma das utilizações mais seguras [30]. Assim, é essencial um

conhecimento aprofundado das características do pDNA para aplicação numa abordagem terapêutica.

Os estudos relativos a esta temática têm evoluído no sentido de permitir uma produção de plasmídeos em maior escala e mais económica, sem que a pureza e a qualidade sejam comprometidas [36]. De facto, quando comparados com os vetores virais, os plasmídeos são mais atrativos em termos de segurança, estabilidade, toxicidade e facilidade de produção à escala industrial. No entanto, este vetor de DNA tem ainda que ser sujeito a algumas otimizações, de modo a que possa ser equiparado aos vetores virais ao nível da eficiência de transfeção [35].

Os plasmídeos ocorrem naturalmente em bactérias, tendo a capacidade de se replicar de uma forma autónoma, isto é, de forma independente do ciclo celular do hospedeiro. Estruturalmente consistem numa molécula de DNA circular, de cadeia dupla, e são produzidas com recurso a plataformas biotecnológicas que utilizam organismos procarióticos como hospedeiros, nomeadamente a *Escherichia coli* (*E. coli*) [27,28,30].

Os plasmídeos são portadores de um gene de origem de replicação, que permite que o pDNA se replique independentemente do DNA da bactéria e de um gene de resistência a um antibiótico que garante a seleção e produção do plasmídeo de interesse. Adicionalmente, a unidade de expressão é constituída pelo gene de interesse, que contém a informação necessária para a produção da proteína pretendida e por uma sequência de adeninas, que permite uma expressão mais eficiente do material genético terapêutico [2,3,37,38]. Na figura 5 estão representadas as diversas regiões constituintes do plasmídeo.

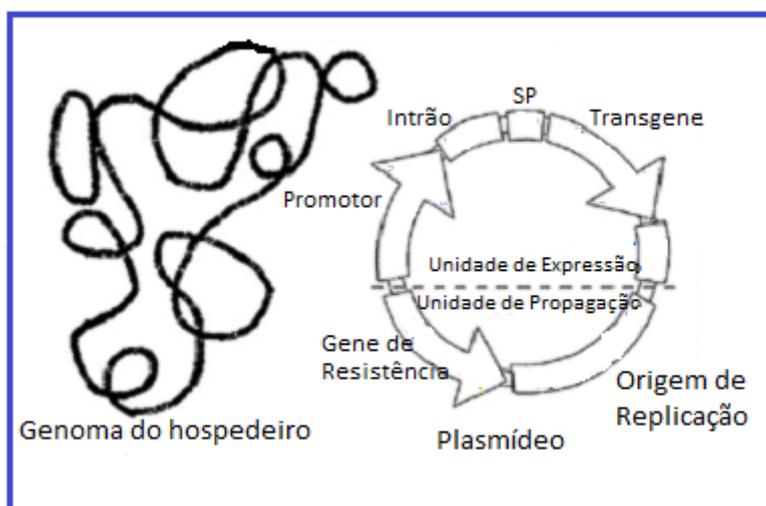


Figura 5 - Esquemática de DNA genómico e de um plasmídeo, onde se podem observar as principais regiões integrantes do pDNA: o gene de resistência e a origem de replicação, constituintes da unidade de propagação; e o gene de interesse e uma sequência poliadenilada correspondentes à unidade de expressão (adaptado de [38]).

O pDNA apresenta carga negativa devido à presença dos grupos fosfato dos nucleótidos que compõem a cadeia dupla de DNA [29,31]. Para além disso, o DNA encontra-se extremamente compactado, resultando numa estrutura superenrolada. Esta disposição, resulta numa zona exterior mais hidrofílica, em consequência da presença dos açúcares e grupos fosfato, e um interior mais hidrofóbico devido à disposição das bases da dupla hélice [29]. Devido a estas características é essencial um controlo rígido das condições do ambiente em que se insere o pDNA, nomeadamente o pH e a temperatura, dado que podem ocorrer facilmente diversos tipos de interações, por exemplo, eletrostáticas ou hidrofóbicas, que podem culminar na sua degradação e consequente perda de função [27,28,30,31].

Relativamente à estrutura, o material genético apresenta-se numa forma extremamente compactada, o que origina uma maior ocorrência da conformação superenrolada (sc) [29]. Para além desta isoforma, podem ainda ocorrer as conformações circular aberta e linear, que são consequência de um corte numa única cadeia ou na cadeia dupla da conformação sc, respetivamente [39]. As agências reguladoras, como a “Food and Drug Administration” (FDA) consideram que a isoforma superenrolada é a mais eficiente e ditam também que esta só pode ser aplicada num contexto clínico se for garantida uma pureza superior a 97% [28,31]. Deste modo, é essencial assegurar que o plasmídeo é manipulado o mais cuidadosamente possível, para que não ocorram danos na isoforma sc e assim não seja comprometida a utilização e a eficácia do processo [2].

De forma a cumprir todos os pré-requisitos impostos pelas agências reguladoras e assegurar a qualidade do pDNA, é essencial garantir um controlo rígido de todos os passos da plataforma biotecnológica de produção do plasmídeo [2]. Deve também ser garantida a pureza do plasmídeo, cumprindo os critérios de eliminação dos constituintes do hospedeiro, nomeadamente endotoxinas, DNA genómico, RNA e proteínas [28,30,31,35]. Daqui se depreende que o processo biotecnológico de produção do pDNA é dividido em duas etapas principais: “upstream”, que engloba a produção do pDNA por organismos geneticamente modificados; e “downstream” que corresponde ao isolamento e purificação do plasmídeo [2]. Em última instância, pode igualmente afirmar-se que é essencial um equilíbrio entre o desenvolvimento de estratégias que permitam um processo de produção o mais rentável possível e uma estratégia de purificação que possibilite o isolamento eficaz do plasmídeo, na conformação superenrolada, dos restantes contaminantes e isoformas.

1.2.1. Processo *Upstream* - Construção e produção do plasmídeo

A primeira abordagem relativa à utilização do plasmídeo como uma ferramenta de clonagem de DNA foi concretizada em 1973, por Stanley Cohen e colaboradores. Neste estudo foram utilizadas enzimas de restrição, para o reconhecimento de sequências específicas de DNA [40]. Desde então têm sido desenvolvidos inúmeros estudos com o propósito de efetivar a aplicação do pDNA como vetor numa vertente terapêutica de doenças complexas [4]. Assim, e de modo que o pDNA possa ser aplicado neste contexto terapêutico, é de extrema importância que o

design desta biomolécula cumpra alguns requisitos [39]. Os plasmídeos são constituídos por duas regiões funcionais essenciais [35]: a eucariótica que é responsável por uma posterior expressão, sendo constituída por promotores, sinais de expressão e pelos genes de interesse; e a de amplificação bacteriana que é composta por marcadores, nomeadamente os genes que conferem a resistência aos antibióticos, pela origem de replicação e pelos motivos CpG não metilados [2,3,41]. Todas estas informações são essenciais para o primeiro passo da plataforma biotecnológica, isto é, para a construção do vetor contendo o gene que codifica a informação de interesse. Posteriormente, é necessário que o plasmídeo de interesse seja incorporado na célula hospedeira (processo de transformação) para que ocorra a sua amplificação [42].

O passo subsequente ao processo de transformação apesar de fulcral, uma vez que deste podem advir passos de purificação mais eficazes e económicos [39], é de realização relativamente simples [43] e consiste na produção do plasmídeo nos hospedeiros recombinantes, sendo usualmente selecionados os sistemas procarióticos. O sistema bacteriano é selecionado tendo em consideração o objetivo proposto, de modo a que se potenciem os rendimentos, permitindo uma maior produção do plasmídeo e idealmente minimizando o teor de impurezas, tais como as restantes isoformas, endotoxinas, proteínas, RNA e DNA genómico. De um modo geral, pode afirmar-se que este passo tem como objetivo fundamental a produção de uma elevada quantidade de plasmídeo [32], maioritariamente na conformação superenrolada [2]. Por conveniência, o hospedeiro ideal para este tipo de utilização é a *E. coli* [27] que tem sido descrito como muito efetivo na produção de pDNA [38,44]. A aplicação deste microrganismo no contexto abordado advém de algumas vantagens que lhe são inerentes, nomeadamente a capacidade de atingir uma elevada densidade celular num período de tempo relativamente curto e com um consumo reduzido de nutrientes, o facto de ser económico, ser bem caracterizado geneticamente e ser compatível com uma grande variedade de vetores disponíveis [36]. Na literatura são referidas diversas estratégias relativas ao processo de produção do plasmídeo com recurso ao hospedeiro referido, que podem englobar manipulações de condições como a temperatura, pH, composição do meio de cultura e otimizações relacionadas com o tipo de bioreator utilizado [45]. Contudo, é importante referir que, atualmente têm sido explorados agentes bacterianos alternativos que também permitem bons resultados [44].

Resumindo, pode afirmar-se que os principais requisitos desta fase “*upstream*” abrangem uma correta seleção do plasmídeo e do microrganismo, assim como uma otimização das condições de crescimento, de modo a que se produza um plasmídeo superenrolado, puro, estável e em elevadas quantidades [46].

1.2.2. Processo *Downstream* - Isolamento do plasmídeo

Terminada a primeira fase da plataforma biotecnológica correspondente à produção do plasmídeo através da fermentação, segue-se o processo de “*downstream*”. Este passo é

fortemente dependente do processo “*upstream*”, uma vez que a presença de impurezas e contaminantes, considerando a sua diversidade e quantidade, vai afetar a eficiência dos passos de purificação [46]. Esta etapa é extremamente importante, uma vez que é essencial que se cumpram os requisitos determinados pelas entidades reguladoras [31], que estipulam a percentagem máxima de componentes que é permitida, de modo a que o DNA terapêutico possa ter uma aplicação biológica. Na tabela 3 são descritas algumas das condições que devem ser garantidas na purificação do pDNA.

Tabela 3 - Condições estabelecidas pelas agências reguladoras relativamente à presença de contaminantes de plasmídeo resultantes da plataforma biotecnológica.

Biomolécula	Quantidade Regulamentada	Referências
Isoforma superenrolada	> 97%	[28,29,31]
Proteínas	Não detetáveis	
RNA	Não detetável	
gDNA	< 2 µg/mg de plasmídeo	
Endotoxinas	< 10 EU/mg de plasmídeo	

O processo “*downstream*” inicia-se com um passo de extração, uma vez que a biomolécula de interesse se encontra no interior do microrganismo hospedeiro utilizado para a produção. Por norma, a lise alcalina é o método mais utilizado para a recuperação de ácidos nucleicos [47] e foi originalmente descrito por Birnboim e Doly [48]. Este procedimento de desintegração é economicamente favorável relativamente aos demais estabelecidos e cumpre as normas impostas pelas agências reguladoras [39]. A lise alcalina baseia-se na utilização de soluções básicas que destabilizam a membrana celular permitindo a libertação das biomoléculas [43]. Durante este passo, são também libertadas impurezas, tais como o gDNA e o RNA, que, alternativamente, poderiam ser eliminados com a adição de passos desnaturantes e da enzima RNase. Contudo, o pDNA resultante desta última estratégia não poderia ser aplicado para fins terapêuticos, uma vez que, neste tipo de aplicação, não podem ser utilizadas enzimas de origem animal. Após este primeiro passo de extração podem ser realizados alguns passos de concentração e clarificação da amostra, por adição de isopropanol e sulfato de amónio respetivamente, que permitem a redução de algumas impurezas [29,46].

Dado que, dos processos anteriores, resulta um extrato ainda com algum conteúdo de impurezas, posteriormente será essencial a aplicação de passos cromatográficos, a fim de obter

um pDNA de elevada qualidade e pureza. Na figura 6 pode observar-se um esquema de todo o processo, desde a produção até à aplicação terapêutica final do pDNA.

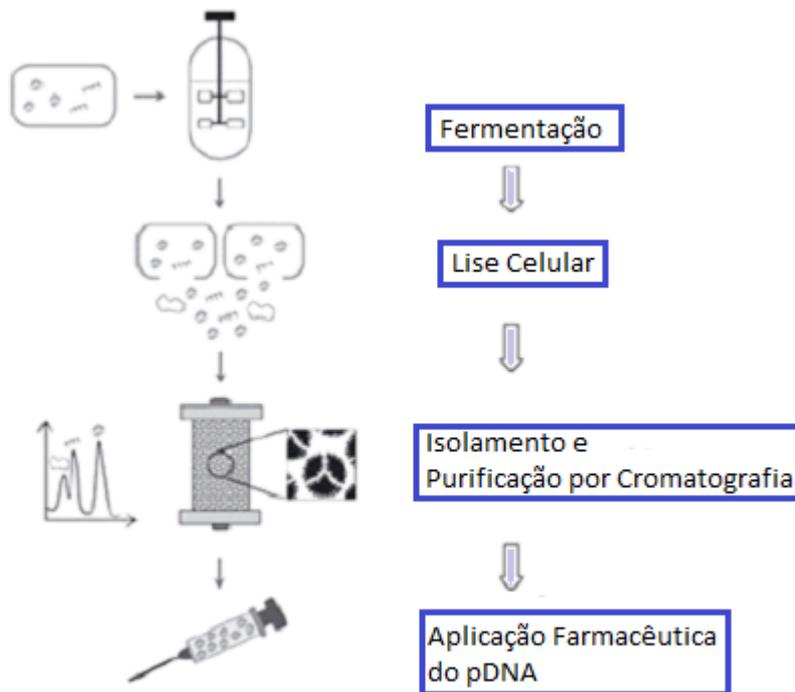


Figura 6 - Plataforma biotecnológica de produção de pDNA. Este processo inicia-se com a produção com recurso a microrganismos, seguida de uma ruptura membranar com o intuito de tornar possível o acesso ao pDNA. Posteriormente, o pDNA é isolado e purificado de modo a que seja possível uma ação terapêutica, cumprindo as normas impostas pelas agências reguladoras, como a FDA (adaptado de [47]).

1.2.2.1. Purificação do pDNA

Nas secções anteriores foram abordados os passos para a produção e isolamento do pDNA, sendo importante realçar que, para além do objetivo de obtenção de elevadas quantidades de plasmídeo terapêutico, é também essencial que este mantenha uma elevada qualidade [47]. Relativamente à pureza deste produto, destaca-se a necessidade de obter uma percentagem superior a 97% de pDNA superenrolado e a inexistência ou presença vestigial de alguns contaminantes, desde que não sejam ultrapassadas determinadas concentrações estabelecidas pelas agências reguladoras [28,29,31,39].

A cromatografia é considerada o método de eleição para a purificação do pDNA [2,39] e baseia-se num sistema em constante dinâmica que explora a maior afinidade e distribuição das biomoléculas pela fase móvel ou pela fase estacionária, permitindo a separação dos componentes de uma amostra complexa [47]. A separação de biomoléculas através desta técnica será dependente das suas características [46], nomeadamente do tamanho, da carga, da hidrofobicidade e da acessibilidade das bases nucleotídicas para os ligandos [29]. A maior dificuldade para a purificação do pDNA prende-se com o facto de que o pDNA superenrolado e outras isoformas e impurezas partilham muitas características, nomeadamente a carga negativa, o tamanho idêntico e a hidrofobicidade semelhante [2,29,31,47]. Na tabela 4 podem

observar-se as características físicas, químicas e estruturais partilhadas pelo pDNA e as restantes biomoléculas resultantes do lisado do hospedeiro.

Tabela 4 - Propriedades físicas, químicas e estruturais similares para o pDNA e as restantes biomoléculas (adaptado de [47]).

<i>Parâmetro</i>	<i>oc pDNA</i>	<i>sc pDNA</i>	<i>gDNA</i>	<i>RNA</i>	<i>Endotoxinas</i>
<i>Tamanho</i>	✓	✓	✓		✓
<i>Carga Negativa</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Hidrofobicidade</i>		✓		✓	✓
<i>Exposição das Bases</i>		✓		✓	
<i>Conformação dos ácido nucleicos</i>	Circular; Cadeia dupla	Superenrolado; Cadeia dupla	Simple desnaturado / cadeia dupla	Cadeia simples	

Na etapa de purificação de pDNA, e de modo a garantir o seu sucesso, há fatores essenciais a controlar como a concordância entre as características da fase móvel e da fase estacionária [47] e a manipulação das condições experimentais, de modo que sejam estabelecidas interações que permitam uma diferenciação da biomolécula de interesse das restantes, culminando na sua purificação. É também essencial assegurar que todo o processo seja rápido, reproduzível, económico e simples [39,47], tendo como finalidade uma aplicação em contexto prático, garantindo a recuperação do pDNA estável e biologicamente ativo.

1.2.2.1.1. Cromatografia de exclusão molecular

Esta técnica de separação baseia-se na diferença de tamanho existente entre as diversas moléculas presentes no lisado [29]. Uma das vantagens deste processo advém do facto de que partículas de maior peso molecular como o gDNA e o pDNA eluem mais rápido, ao passo que as de menor peso como o RNA, proteínas e endotoxinas eluem posteriormente, dado que conseguem aceder ao interior dos poros da matriz, apresentando um maior tempo/volume de eluição [2,29,46]. Esta técnica é considerada pouco seletiva devido à semelhança entre as diversas isoformas do pDNA e do gDNA, que limita a correta separação [31].

1.2.2.1.2. Cromatografia de troca aniónica

Este processo cromatográfico pode ser aplicado como um método de captura ou de purificação, quer seja a uma escala preparativa quer analítica [49], e permite a separação das diversas biomoléculas presentes na amostra com base nas diferenças de carga e/ou densidade de carga entre as moléculas e a matriz. Os ácidos nucleicos, caracterizados por uma carga negativa conferida pelos grupos fosfato, interagem com os ligandos carregados positivamente da matriz

[2,29]. Por norma, os ligandos utilizados no suporte sólido são “fortes”, nomeadamente as aminas quaternárias, e as interações que se estabelecem são maioritariamente eletrostáticas. Posteriormente, é promovido um gradiente crescente de sal de modo a anular as interações estabelecidas e as moléculas eluem por ordem crescente de densidade de carga [29]. Este método tem muitas vantagens inerentes, tais como, o facto de permitir uma separação rápida, de utilizar um sal (cloreto de sódio) sem implicações negativas para o ambiente ou a biomolécula de interesse e de não serem necessários solventes orgânicos. Contudo, é necessário ter em consideração que, a semelhança química e estrutural entre o pDNA sc e as restantes biomoléculas pode dificultar a sua separação [2,29].

1.2.2.1.3. Cromatografia de interação hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica baseia-se na utilização de ligandos hidrofóbicos que estabelecem interações com as regiões não polares das biomoléculas existentes no lisado que contém o pDNA. A retenção das biomoléculas ocorre na presença de altas concentrações de sulfato de amónio, de modo a que seja removida a água de hidratação em torno dos grupos hidrofóbicos, sendo possível a ligação das biomoléculas aos ligandos. Posteriormente, com o intuito de eluir as moléculas retidas na matriz, é promovida uma diminuição da concentração de sal, que enfraquece as interações hidrofóbicas. Esta necessidade de utilização de elevadas concentrações de sal é vista como uma desvantagem, uma vez que está associada a altos custos e a um impacto ambiental negativo [2,29].

1.2.2.1.4. Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade é uma técnica única na purificação de biomoléculas, uma vez que tira partido das propriedades biológicas e químicas das biomoléculas para estabelecimento de interações específicas. Os ligandos usados neste processo podem ser naturais ou sintéticos, contudo, na literatura tem sido descrita a preferência pelos ligandos de natureza sintética uma vez que combinam a seletividade dos ligandos naturais com a eficácia e a durabilidade dos sistemas sintéticos. Desta forma, pode afirmar-se que a escolha do ligando é essencial para a implementação de uma estratégia viável de purificação, uma vez que este irá influenciar fortemente o tipo de interações que ocorrerão, podendo estas ser uma conjugação de forças não-covalentes, nomeadamente eletrostáticas, hidrofóbicas, forças de van der Waals e pontes de hidrogénio. Após retenção, a eluição das diversas biomoléculas pode ser promovida especificamente utilizando ligandos competitivos, ou de um modo não específico, através da manipulação de condições de eluição como o pH, a temperatura e a força iónica [2,29,30,46].

Presentemente, há uma grande diversidade de técnicas de afinidade para a purificação de ácidos nucleicos, nomeadamente, a cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados (IMAC), a cromatografia de afinidade de tripla-hélice, a cromatografia de afinidade proteínas-DNA e a cromatografia de afinidade com aminoácidos [2]. A utilização de aminoácidos para a purificação de pDNA é um conceito promissor e já foi descrito na literatura,

com aplicação de histidina [50], arginina, lisina, tirosina e derivados de aminoácidos [27-29,31,51,52] como ligandos específicos. Relativamente à arginina, a sua utilização conduziu a resultados muito promissores na purificação do plasmídeo sc, permitindo a manutenção da sua estabilidade e eficácia biológica, através da aplicação de um suave gradiente crescente de cloreto de sódio ou da adição da arginina como agente de competição [51]. Mais recentemente, a utilização da agmatina, derivado de uma descarboxilação da arginina, revelou também resultados muito promissores no isolamento do pDNA sc [30].

É imperativo também denotar que, apesar da cromatografia de afinidade suscitar algumas questões relacionadas com a origem biológica dos ligandos, é altamente eficiente e permite elevados rendimentos e a redução e/ou eliminação de passos cromatográficos adicionais [2,29]. De um modo geral, pode afirmar-se que esta estratégia de purificação é uma escolha viável para o isolamento do pDNA superenrolado, de acordo com os padrões de qualidade estabelecidos pelas entidades reguladoras.

1.2.2.1.5. Agmatina e Histamina - ligandos para cromatografia de Afinidade

A utilização de aminoácidos/derivados de aminoácidos como ligandos na cromatografia de afinidade tem sido extensivamente estudada devido à sua capacidade de promover um conjunto de interações com os ácidos nucleicos [30]. Na literatura estão descritos diversos casos de sucesso da aplicação da L-arginina e da L-histidina neste contexto [27,31,50,51], contudo, recentemente foi estudada a aplicação de derivados destes aminoácidos, a agmatina e a histamina, respetivamente, para a purificação de plasmídeos. Neste caso, a capacidade da agmatina e histamina para estabelecerem interações mais intensas com os ácidos nucleicos, conduziram a um aumento dos seus tempos de retenção [30]. Estes derivados de aminoácidos são caracterizados pela ausência do grupo carboxílico, comparativamente ao aminoácido original, havendo assim uma diminuição da repulsão entre o ligando e os grupos fosfato dos ácidos nucleicos [53]. Quando aplicadas na cromatografia, estas duas moléculas manifestam um carácter multimodal dada a sua versatilidade, isto é, através da correta manipulação das condições de eluição aplicadas podem ser mais fortemente exploradas interações eletrostáticas ou hidrofóbicas. O tipo de sal aplicado, o pH, o tampão, juntamente com outras condições promovem preferencialmente determinadas interações, e com estes ligandos é até possível conjugar diferentes condições de modo a aumentar a seletividade para a molécula de interesse [30,52,54,55].

A agmatina ocorre naturalmente em sistemas biológicos como um neurotransmissor/neuromodulador e como referido anteriormente resulta de uma descarboxilação da arginina [30]. Este derivado de aminoácido tem um pKa >12,5 e a sua utilização pode ser baseada na manipulação do pH, uma vez que valores de pH inferiores ao pKa conferem ao ligando uma carga positiva permitindo assim a interação com os ácidos

nucleicos, sendo a interação mais forte quanto mais baixo for o pH. Para além destas interações, a agmatina consegue também estabelecer com os ácidos nucleicos interações por pontes de hidrogénio, catião π e interações hidrogénio π [30,55].

A nível biológico, a histamina está envolvida em diversos processos de regulação a nível cerebral [30]. Esta molécula possui o mesmo carácter multimodal da agmatina, contudo esta é mais fortemente influenciada pelo pH dado que o seu pKa é 7,05 a 25°C, sendo assim carregada positivamente para valores de pH inferiores ao pKa, e negativamente para valores de pH superiores. Esta molécula possui um anel de imidazol que vai influenciar fortemente as interações que ocorrem em condições maioritariamente hidrofóbicas. Esta estrutura também pode favorecer o estabelecimento de forças de van der Waals, pontes de hidrogénio e interações π - π . Quando são utilizadas condições mais ácidas, o anel de imidazol encontra-se protonado permitindo também que ocorram interações eletrostáticas e interações catião π com os ácidos nucleicos [30,52]. Na figura 7 pode observar-se a estrutura química dos dois compostos referidos.

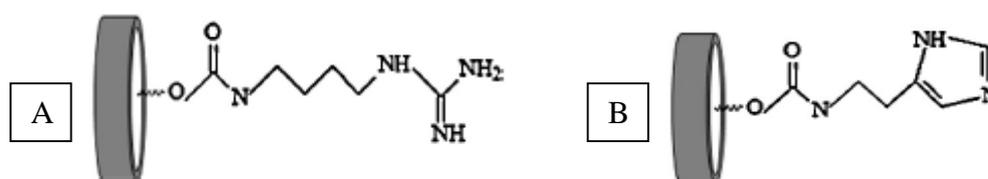


Figura 7 - Composição dos derivados de aminoácidos imobilizados nos discos monolíticos: A- Agmatina, B - Histamina (adaptado de [30]).

O carácter multifuncional da agmatina e da histamina juntamente com a correta manipulação de condições como a concentração do sal, o tipo de tampão de eluição utilizado, aplicação de agentes de competição, manipulação do pH, entre outros, conferem boas perspetivas para a aplicação em cromatografia e posterior purificação de determinadas biomoléculas, nomeadamente a isoforma superenrolada do DNA minicircular (mcDNA).

1.2.2.2. Suportes Monolíticos

O conceito da tecnologia monolítica foi introduzido pela primeira vez no início dos anos 90 [56] e presentemente tem sido alvo de um crescente interesse, dado que lhe são inerentes inúmeras características que permitem o contornar de muitas desvantagens associadas aos processos convencionais de purificação. Os monolitos são considerados a quarta geração no que concerne às fases estacionárias dos processos cromatográficos [47,57,58] e consistem num material sólido com canais tridimensionais interconectados e altamente porosos [2,39], permitindo assim elevada capacidade de ligação de biomoléculas de maiores dimensões [52], como os vírus e o DNA [59]. Os canais deste material formam uma estrutura muito característica que permite que a fase móvel os atravesse [57], com elevados caudais sem que lhe estejam associadas pressões acrescidas [2,56]. Outra particularidade associada a esta tecnologia prende-se no facto de que

os causais apresentam um comportamento convectivo, do qual advém a possibilidade de utilização de maiores caudais [58]. Em conclusão, pode afirmar-se que as características que enquadram os monolitos numa ciência inovadora e única são a elevada porosidade, a capacidade de ligação a moléculas de maiores dimensões e a utilização de caudais convectivos.

No geral, estas características permitem a realização de ensaios mais rápidos, com separações altamente eficientes que resultam numa elevada pureza [2]. É importante salientar que a tecnologia descrita é também muito mais facilmente aplicada a uma escala industrial quando comparada com as técnicas convencionais de purificação [47,58].

Os monolitos podem assumir diferentes formatos, dependendo da aplicação pretendida, nomeadamente, discos rígidos cilíndricos ou tubos cónicos, e o tamanho dos canais é definido pela polimerização, ou seja, este pode ser manipulado de modo a suprir as necessidades do objetivo proposto [47]. Para além disso, esta estratégia permite também uma liberdade na escolha do material a utilizar no suporte, com o intuito de promover interações com as moléculas o mais eficientemente possível [56]. Estes suportes têm sido muito explorados para uma aplicação a nível da purificação de diversas biomoléculas, tais como vírus, ácidos nucleicos e proteínas [58].

De um modo conciso, pode constatar-se que a tecnologia monolítica surge como um conceito inovador e altamente atrativo com potencial aplicação à escala industrial, numa ampla variedade de condições que podem ser manipuladas dependendo da biomolécula alvo e do resultado final pretendido [58].

1.3. DNA minicircular

Nos capítulos anteriores têm sido descritas inúmeras características inerentes ao pDNA que fazem deste um biofármaco altamente atrativo. Contudo, existem algumas particularidades que colocam em causa a sua aplicação a um nível clínico, nomeadamente a presença de elementos necessários à etapa de produção nas bactérias recombinantes, que podem conduzir a uma resposta terapêutica ineficiente, e com possíveis complicações clínicas [3,37]. Neste contexto, surge o mcDNA como uma alternativa promissora e mais vantajosa, visto que constitui uma perspetiva melhorada do pDNA, não contendo estas unidades estruturais responsáveis pela produção na unidade bacteriana, sendo considerado seguro e com a capacidade de promover elevados níveis de expressão génica [3].

O mcDNA foi descrito pela primeira vez na literatura em 1968, produzido com recurso à *E. coli*. Neste estudo pioneiro encontrava-se ainda por definir a função desta biomolécula, sabendo-se apenas que esta constituía uma molécula de menores dimensões relativamente ao plasmídeo originalmente descrito [60]. Presentemente, o mcDNA é também classificado como sendo um vetor não viral, com uma estrutura superenrolada, frequentemente produzido em bactérias recombinantes e com elevado potencial terapêutico.

1.3.1. Produção e estrutura do mcDNA

O mcDNA tem uma estrutura superenrolada e é caracterizado pela ausência de sequências referentes à produção bacteriana. O mesmo é gerado com recurso a hospedeiros, como a *E. coli*, e resulta de uma recombinação intramolecular que culmina na formação de duas estruturas: o mcDNA e o miniplasmídeo (mP) [6,37,41,61]. Estes dois componentes resultam do plasmídeo parental (PP), primariamente produzido no sistema bacteriano que vai dar origem ao mcDNA e mP com recurso a uma recombinase. O mP é constituído pela unidade responsável pela produção no hospedeiro bacteriano, e o mcDNA é formado pela “cassete” eucariótica responsável pela expressão do gene terapêutico [3,37,61].

A fase de recombinação do PP resulta da ação de recombinases que atuam em sequências específicas. Inicialmente, este processo foi efetivado com recurso ao sistema “lambda integrase”. Neste estudo, a recombinase foi expressa numa estirpe de *E. coli*, mas verificou-se um baixo rendimento na conversão do PP em mcDNA e mP e níveis de toxicidade indesejáveis [62,63]. Outra abordagem utilizada mais recentemente, e que permitiu resultados mais promissores, consiste na utilização da recombinase serina phiC31 que atua nos sítios attB e attP, promovendo a formação das biomoléculas pretendidas. Este sistema tem a vantagem de ser mais eficiente, derivado de um processo mais simplificado e com menores custos associados [61].

Para a conversão do PP em mcDNA e mP é usada a L-arabinose como indutor da recombinação. Esta promove a expressão da recombinase serina phiC31 que atua nos sítios específicos, conduzindo à produção de mcDNA e mP. Do processo descrito resulta o mcDNA, mas também o mP e vestígios do PP que não foi convertido, e que devem ser eliminados, já que se tratam de impurezas. Assim, foi implementado um processo com recurso à endonuclease *I-SceI* que atua em locais específicos do mP e do plasmídeo parental resultando na sua clivagem e eliminação [37]. Ainda assim, e apesar de alguns destes componentes serem eliminados, o extrato final apresenta ainda moléculas de mP e PP, sendo por isso essencial a implementação de um processo posterior de purificação. Na figura 8 pode observar-se a esquematização do processo de produção do mcDNA descrito.

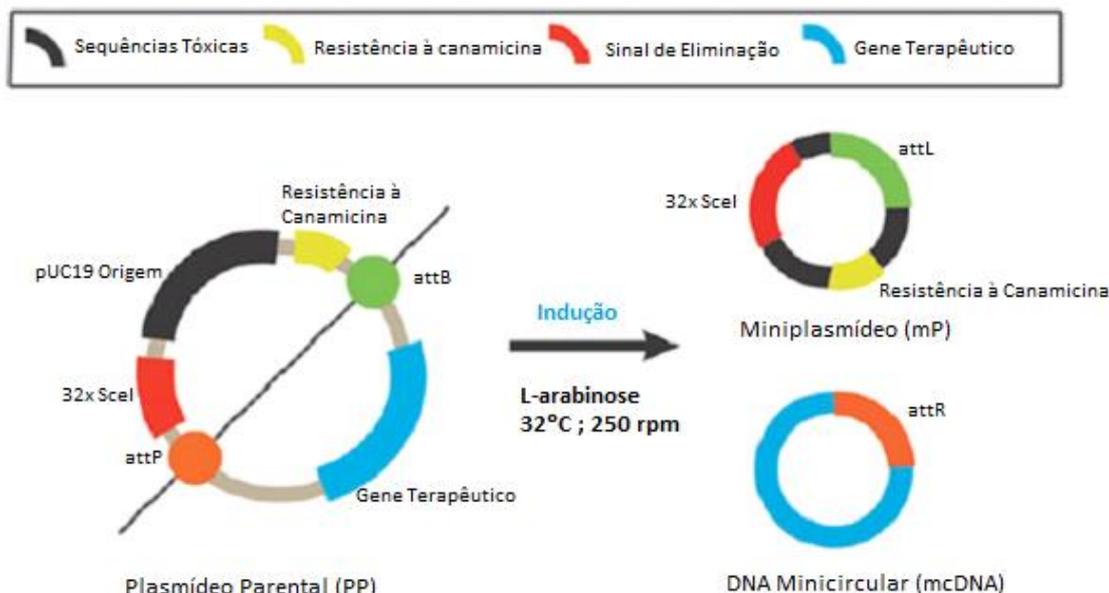


Figura 8 - Esquematização do processo de produção de mcDNA. A L-arabinose induz a expressão da recombinase serina phiC31 que promove a formação de mP e mcDNA a partir do PP (adaptado de [37]).

No processo de produção de mcDNA é também fundamental controlar os parâmetros que poderão influenciar quer o nível de produção do mcDNA quer o nível de impurezas. Os principais parâmetros a otimizar são a temperatura, o tempo de conversão e a concentração do indutor. Estudos anteriores revelaram que, uma produção a 42 °C seguida de um processo de indução pela L-arabinose a 32 °C, aumentam os rendimentos de produção de mcDNA. Relativamente ao tempo de indução e à concentração de indutor, está descrito que os mesmos dependem do processo de recombinação implementado [37].

Em suma, através dos tópicos anteriormente descritos pode constatar-se que estão determinadas as condições para uma produção eficiente do mcDNA e que este constitui uma abordagem promissora com um amplo espectro de potencial aplicação numa vertente terapêutica [37].

1.3.2. Estratégias de purificação do mcDNA

Têm sido desenvolvidos alguns estudos com o intuito de implementar uma estratégia que permita a purificação do mcDNA e posterior aplicação num contexto terapêutico. Contudo, estes desenvolvimentos enfrentam dificuldades impostas pela complexidade da amostra inicial, visto que, juntamente com o mcDNA, estão também presentes moléculas de PP e de mP [64].

Neste sentido, Chen e colaboradores estabeleceram uma estratégia que permite alguma separação do mcDNA, através da utilização de enzimas de restrição que degradam o mP e o PP. Contudo, este método não foi bem-sucedido, uma vez que não permite um isolamento total do mcDNA [61]. Para além disso, envolvia a utilização de enzimas de restrição, que podem comprometer a aplicação à escala industrial [65]. Outros estudos realizados pela equipa de

Mayrhofer conduziram à implementação de uma estratégia de purificação do mcDNA, sendo estes baseados em cromatografia de afinidade através de interações que se estabelecem entre as proteínas e o DNA. Esta técnica é baseada na interação que se estabelece entre o repressor da lactose e o respectivo operão. Assim, o mcDNA a purificar contém um operão da lactose modificado que irá reconhecer a proteína imobilizada na matriz, que contém o operão repressor, estabelecendo-se assim uma interação entre estas duas espécies. Posteriormente, através de uma estratégia de competição, que passa pela adição de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosideo, esta interação será quebrada, havendo eluição do mcDNA isolado [66]. Esta estratégia tem a desvantagem de envolver um passo prévio de incorporação do operão da lactose no DNA, de modo a que este possa estabelecer interação com a matriz cromatográfica. Uma outra abordagem recente de purificação do mcDNA envolve a linearização do mP utilizando endonucleases. Nesta estratégia, é aplicado posteriormente um passo de cromatografia de interação hidrofóbica [64]. De uma forma geral, e para além da utilização de enzimas para a digestão do mP, este método tem a desvantagem de utilizar o sulfato de amónio para a eluição das diversas espécies retidas na matriz, visto que este reagente está descrito na literatura como sendo nocivo para o meio ambiente [2,29].

Pode então afirmar-se que é essencial o desenvolvimento de uma estratégia de purificação que permita uma separação eficaz do mcDNA, cumprindo as condições impostas pelas agências reguladoras, nomeadamente no que diz respeito à utilização de produtos de origem animal e de reagentes nocivos. Assim, o presente trabalho visa estabelecer uma estratégia de purificação, através de cromatografia de afinidade usando suportes monolíticos modificados com derivados de aminoácidos, que permita solucionar os problemas anteriormente enunciados e que permita a obtenção do mcDNA com elevada pureza e qualidade.

CAPÍTULO 2 - Objetivos

O trabalho descrito propõe estudar o bioreconhecimento que determinados derivados de aminoácidos conseguem estabelecer com uma amostra de mcDNA. Assim, após um conhecimento intrínseco do tipo de interações que se estabelecem com os ligandos de histamina e agmatina, foram manipuladas condições de eluição, como o pH, a concentração ou tipo de sal, de modo a isolar a isoforma sc do mcDNA durante os passos cromatográficos. Esta biomolécula purificada pode posteriormente ser aplicada em terapias, contudo, deve ter-se em conta que a sua pureza assim como presença de contaminantes deve respeitar as normas estabelecidas pelas agências reguladoras.

Para a obtenção de uma biomolécula de mcDNA na isoforma sc pura é essencial aplicar um processo *upstream* para a produção do plasmídeo parental e conversão em mcDNA com a adição do indutor de L-arabinose e um processo *downstream* eficaz para isolar e purificar o mcDNA. Os primeiros passos (produção e extração) são essenciais, visto que quando otimizados permitem o alcance de uma amostra menos complexa, facilitando o processo de purificação. Assim sendo, como a produção do plasmídeo é intrínseca é necessário realizar uma lise alcalina acompanhada de passos de pré purificação. Por fim, é então aplicada cromatografia de afinidade com recurso a discos monolíticos, imobilizados com os ligandos de histamina ou agmatina (derivados de aminoácidos). Desta forma, este trabalho tem como objetivo a realização de um processo *downstream* eficaz e o mais rentável possível acompanhado do estudo dos monolitos imobilizados com histamina e agmatina de modo a que seja possível a purificação do mcDNA na isoforma sc. Para maximizar o rendimento do mcDNA, é essencial ter conhecimento do tipo de interações que se podem estabelecer, portanto, grande parte deste trabalho passa também por perceber o bioreconhecimento que se estabelece entre os ligandos e a amostra de mcDNA.

De um modo geral, este trabalho pretende estabelecer uma nova plataforma biotecnológica que permita a purificação do mcDNA na isoforma sc para aplicação em diversos tipos de patologias com recurso à terapia génica.

CAPÍTULO 3 - Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Durante a produção foi utilizada a estirpe bacteriana *E. coli* ZYCY10P3S2T transformada com o vetor pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40 poliA de 7,06 kpb, sendo estes obtidos na empresa System Biosciences. Os reagentes utilizados para as culturas bacterianas (triptona e extrato de levedura) foram adquiridos à Bioakar Diagnostics. O meio LB foi adquirido à Panreac.

Para a lise alcalina foi utilizado o *kit Qiagen Plasmid Maxi*, da Qiagen. Para as digestões enzimáticas foram utilizadas as enzimas Nde I, BamH I e a EcoR I, da NZY Tech, Lda.- Genes and Enzymes, Lisboa, Portugal. Para as eletroforeses foi utilizado Greensafe Premium obtido de NZYTech, Lda.- Genes and Enzymes, Lisboa, Portugal. Os tampões utilizados para os ensaios cromatográficos foram previamente filtrados com membranas cujo tamanho de poro era de 0,2 µm (Schleicher Schuell, Dassel, Alemanha) e desgaseificados no ultra-som. Os discos monolíticos foram fornecidos pela BIA Separations (Ajdovščina, Slovenia). Para a concentração das amostras obtidas nos ensaios cromatográficos foram utilizados concentradores da Vivaspin® (Vivaproducts, Littleton, MA, USA).

As diversas soluções utilizadas foram preparadas com água desionizada de grau ultrapura, purificada com o sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, EUA).

3.2. Métodos

3.2.1. Condições de crescimento bacteriano e Produção do PP

Inicialmente a estirpe bacteriana *E. coli* ZYCY10P3S2T foi transformada com o vetor pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40 poliA de 7,06 kpb, cuja origem de replicação é pUC19 e que contém um gene de resistência à canamicina.

O procedimento inicia-se com a inoculação da estirpe em placas de LB-agar (50 µg/mL, canamicina). Após o crescimento em meio sólido, a fermentação iniciou-se a partir de uma pré-fermentação ($DO_{600\text{ nm}}=2,6$) de modo que a $DO_{600\text{ nm}}$ inicial da fermentação fosse 0,2. O crescimento bacteriano realizou-se num orbital refrigerado (Agitorb 200 IC; Aralab) a temperatura e agitação constante (42 °C e 250 rpm) em erlenmeyers de um litro contendo 250 mL de meio TB (triptona [20 g/L]; extrato de levedura [24 g/L]; glicerol [4 mL/L]; 0,017 M KH_2PO_4 ; 0,072 M K_2HPO_4 , pH 7,0). Ao meio de cultura foi também adicionada canamicina 50 µg/mL e o crescimento foi interrompido no final da fase exponencial ($DO_{600\text{ nm}}\approx 5$). Nesta fase foi obtido o PP, sendo que as amostras bacterianas foram recolhidas através da centrifugação (10 min, 4 °C, 450 g) e armazenadas a -20 °C.

Para além do vetor supracitado, foi também produzido um plasmídeo de menor dimensão com 4,88 kpb (designado de mcDNA Small) usando as mesmas condições referidas.

3.2.2. Síntese do mcDNA

Para a síntese do mcDNA procedeu-se à adição de uma mistura indutora às culturas bacterianas, quando a fermentação apresentava uma densidade ótica (DO) de aproximadamente 5, que consiste em 250 mL de meio LB, 10 mL de 1 M de NaOH e arabinose estéril (20% w/v) para uma concentração final de 0,01%, sendo que o pH foi ajustado para 7. O processo de recombinação decorreu durante 4 horas, num orbital refrigerado com temperatura e agitação constante (32 °C e 250 rpm). No fim deste procedimento foi obtido o mcDNA, sendo que as amostras bacterianas foram recolhidas através da centrifugação (10 min, 4 °C, 450 g) e as células armazenadas a -20 °C.

3.2.3. Digestão Enzimática

Para a realização da digestão enzimática foram utilizadas as enzimas de restrição Nde I, BamH I e a EcoR I. Em eppendorffs de 1,5 mL foram adicionados 1 µL de enzima, 2 µL de tampão, 1 µg de pDNA e foi adicionada água até perfazer um volume de 20 µL. Após a preparação, realizou-se uma incubação a 37°C, durante 1 hora. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.2.4. Recuperação do mcDNA

3.2.4.1. Lise alcalina com o Kit da Qiagen

Para a extração do mcDNA, do PP, do PP Small e do mcDNA Small utilizou-se o *kit Qiagen Plasmid Maxi*, da Qiagen, recorrendo a algumas modificações ao protocolo facultado pelo fabricante. Inicialmente procedeu-se à ressuspensão do pellet bacteriano em 20 mL de tampão P1 (50 mM de Tris-HCl a pH=8,0; 10 mM de EDTA hidratado; 100 µg/mL RNase A). Seguidamente, adicionaram-se 20 mL de tampão P2 (200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)) de modo a promover a lise das células. Os tubos foram agitados gentilmente e incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos. A etapa de lise é interrompida com a adição de 20 mL de tampão P3 (3,0 M de acetato de potássio a pH 5). De seguida é promovida uma incubação em gelo durante 20 min, seguida de duas centrifugações, de 30 e 15 minutos (20 000 G; 4 °C) das quais resultou a eliminação de alguns contaminantes, tais como restos celulares, gDNA e proteínas. O sobrenadante é adicionado à coluna de troca aniónica previamente equilibrada. Inicialmente removeu-se o RNA, proteínas e moléculas de baixo peso molecular através da adição de um tampão com baixo pH e teor de sal (0,90 M de NaCl). Seguidamente, a eluição do mcDNA foi promovida através da adição de um tampão com pH superior e maior concentração de sal (1,75 M de NaCl). As espécies obtidas neste passo foram precipitadas através da adição de 0,7 volumes de isopropanol, seguido de uma incubação no gelo durante 20 minutos. A amostra obtida foi sujeita a centrifugação (16 000 G; 4 °C; 30 min) e o pellet obtido foi ressuscitado com 1 mL de tampão Tris-EDTA (pH=8; 10 mM). Deste procedimento resultaram amostras de mcDNA, PP, PP Small e mcDNA Small que foram posteriormente utilizadas em ensaios cromatográficos para o isolamento da isoforma superenrolada do mcDNA.

3.2.5. Purificação do mcDNA

3.2.5.1. Cromatografia de Afinidade

Os estudos cromatográficos foram efetuados no sistema AKTA Purifier (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suécia) com o software UNICORN 5.11. Este sistema é constituído por uma unidade de separação compacta e por um computador. Foram utilizados discos monolíticos com um volume de coluna de 0,34 mL (tamanho de poro de 1500 nm de diâmetro) e imobilizados com derivados de aminoácidos (agmatina e a histamina), cuja estrutura molecular se encontra representada na figura 7. Para a purificação do mcDNA o monolito foi equilibrado sem a presença de sal, sendo aplicado o tampão Tris-HCl 10 mM, pH=6 a um caudal de 1 mL/min. Quando as condições de equilíbrio foram alcançadas, procedeu-se à injeção da amostra obtida da lise com recurso a um loop de 200 µL. Com a injeção da amostra nestas condições verificou-se a ligação total e, posteriormente foi aplicado um gradiente crescente de NaCl de modo a promover a eluição das biomoléculas retidas. As frações correspondentes a cada pico foram recuperadas e concentradas através de centrifugação, e lavadas de modo a remover o sal presentes. De seguida foram analisadas através de gel de agarose. Todos os ensaios cromatográficos foram realizados à temperatura ambiente e a absorvância foi continuamente monitorizada a 260 nm. No final dos ensaios cromatográficos, os monolitos e o sistema AKTA Purifier foram limpos com água Mili-Q.

3.2.5.2. Eletroforese em gel de agarose

As amostras obtidas no final do processo de lise e em cada ensaio cromatográfico foram analisadas por eletroforese horizontal (Clever Scientific) com um gel de agarose a 0,8% e com um comprimento de 15 cm (Hoefer, San Francisco, CA, USA) corado com 0,06 µL de Greensafe. A eletroforese decorreu durante 30 min a 120 V em tampão TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH=8). O gel foi analisado sob luz ultravioleta (UV), com utilização do sistema Uvitec Cambridge Fire-Reader UV equipado com uma câmara (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK).

CAPÍTULO 4 - Resultados e discussão

No presente trabalho pretendeu-se estabelecer uma plataforma biotecnológica inovadora que permitisse a obtenção de mcDNA na isoforma sc com um grau de pureza adequado a uma possível aplicação em terapia génica com foco em diversos tipos de doenças. Para tal, é necessário o desenvolvimento de um processo de purificação que permita a recuperação de mcDNA na isoforma sc e a eliminação simultânea dos contaminantes, tal como estabelecido pelas agências reguladoras. Para a purificação da biomolécula de interesse foi aplicada cromatografia de afinidade com recurso à tecnologia monolítica. Os discos monolíticos utilizados neste trabalho encontram-se modificados com os derivados de aminoácidos histamina e agmatina (usados como ligandos). Durante o processo cromatográfico foram manipuladas várias condições de ligação e eluição de forma a purificar a isoforma sc do mcDNA. Em paralelo, com este trabalho foi igualmente possível estudar o bioreconhecimento do mcDNA pelos derivados de aminoácidos de modo a ter o máximo conhecimento sobre o tipo de interações que podem ser estabelecidas entre a amostra e os ligandos, para que se possa realizar uma manipulação e otimização mais adequada dos processos cromatográficos.

A obtenção do mcDNA foi possível através da sua biossíntese em *E. coli*, seguida da realização de um processo de recuperação acompanhado de passos de clarificação e concentração. Nestes passos preliminares são eliminados alguns contaminantes de modo a facilitar o processo cromatográfico. Contudo, a sua eliminação não é total, existindo ainda juntamente com as biomoléculas de interesse gDNA, proteínas, endotoxinas, PP e outras isoformas do mcDNA. Assim sendo, é essencial estabelecer um processo cromatográfico que permita a separação destes contaminantes da biomolécula de interesse. Neste contexto, ao longo do trabalho foi explorado o bioreconhecimento do mcDNA pelos derivados de aminoácidos histamina e agmatina de modo a promover a sua purificação. A técnica aplicada foi a cromatografia de afinidade usando derivados de aminoácidos como ligandos específicos, encontrando-se estes imobilizados em discos monolíticos. Esta nova tecnologia monolítica tem sido largamente estudada dadas as vantagens que lhe estão associadas, nomeadamente, excelentes capacidades de transferência de massa, elevadas capacidades de ligação e possibilidade de utilização de caudais mais elevados que permitem a realização de ensaios mais rápidos diminuindo assim o tempo do ensaio e por conseguinte a probabilidade de degradação da amostra. Alguns estudos efetuados anteriormente tinham já descrito que os derivados de aminoácidos, histamina e agmatina, conseguem estabelecer interações específicas e isolar a isoforma sc do pDNA, como tal espera-se que também se possam estabelecer interações com o mcDNA, permitindo a sua purificação. Assim sendo, este trabalho propôs-se a avaliar a interação entre o mcDNA e os ligandos derivados de aminoácidos (histamina e agmatina), e estabelecer uma estratégia viável de purificação da isoforma sc do mcDNA usando estes suportes para uma possível aplicação em doenças específicas como o cancro ou a doença do Alzheimer com recurso à terapia génica.

4.1. Produção do mcDNA

A preparação de uma amostra de lisado de células usadas na produção de mcDNA resulta numa amostra bastante complexa, uma vez que para além dos contaminantes associados à produção em *E. coli*, haverá também a presença de espécies que resultam de uma recombinação incompleta. Assim, para além das diferentes conformações do mcDNA é previsível a presença de PP, mP, gDNA, RNA, proteínas e endotoxinas. Para promover uma maior eficiência na recombinação, e por isso aumentar os níveis de produção do mcDNA é necessário o controlo criterioso de alguns parâmetros, nomeadamente, para a etapa de produção do PP: iniciar a fermentação a uma DO de 2,6; controlar a temperatura a 42 °C; usar agitação constante de 250 rpm; interromper a fermentação a uma DO=5. Este protocolo experimental foi previamente explorado por Gaspar e colaboradores [37].

Passada esta fase inicial de produção do PP, deu-se início ao processo de síntese do mcDNA, com a adição de 125 mL da mistura indutora (25 g/L de meio LB e 1,0 M de NaOH, pH=7) a 125 mL do meio de fermentação. A esta mistura foi também adicionado um indutor, a L-arabinose a 0,01% que promove a expressão da recombinase serina phiC31 permitindo a produção do mcDNA e do mP. Foi utilizada esta concentração de indutor visto que estudos desenvolvidos anteriormente pelo grupo mostraram que esta concentração promovia maior produção de mcDNA comparativamente ao PP [37]. Para promover a eliminação de mP e PP residual, a endonuclease *I-SceI* cliva locais específicos na sequência destas biomoléculas. Para facilitar o processo de recombinação, a etapa de indução foi realizada a 32 °C. A DO foi medida de hora a hora durante a fermentação, de modo a garantir o início da indução no momento mais adequado, isto é, no final da fase log, momento em que se tem uma maior densidade celular associado a menor stress metabólico. Resumidamente, o conjunto de condições aplicadas para a indução do mcDNA foram uma temperatura de 32 °C com uma duração de 4 horas, tendo estas sido otimizadas em estudos anteriores [37]. Estas condições estão associadas a rendimentos mais elevados de mcDNA acompanhados de menor quantidade de contaminantes, nomeadamente o PP. A existência de PP em menor quantidade é consequência de uma recombinação mais eficiente que por sua vez conduz a uma maior produção de mcDNA [3,37]. Na figura 9 pode observar-se a curva de crescimento obtida, assim como o resultado da lise das células antes e após a indução.

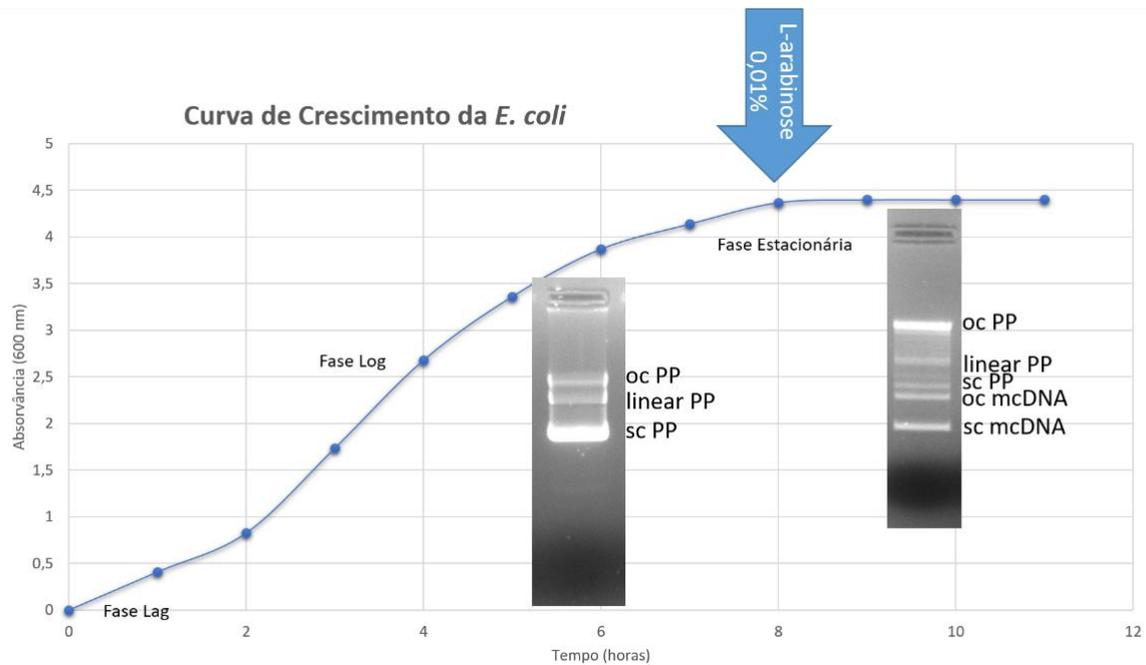


Figura 9 - Curva de crescimento da E. coli transformada com o plasmídeo de interesse. Está igualmente representada a análise eletroforética de amostras de lise de células recolhidas antes e após o processo de indução, onde estão identificadas as diferentes espécies presentes.

Na curva de crescimento obtida podem observar-se as diversas fases características de uma cultura bacteriana. Numa etapa inicial, a bactéria encontra-se na fase lag, que é caracterizada por uma adaptação ao novo meio a que é sujeita. Posteriormente, a cultura é caracterizada por um crescimento exponencial, designado como fase log. Após esta fase, começa a haver uma diminuição da quantidade de nutrientes disponíveis e uma acumulação de metabolitos, o que leva a uma diminuição do crescimento bacteriano, sendo esta fase denominada por estacionária. No início deste momento a produção de PP é interrompida, dando-se início à indução que leva à produção do mcDNA, através da adição de L-arabinose 0,01%. Na curva de crescimento pode também observar-se a eletroforese correspondente à lise de células recolhidas em cada uma das fases, com identificação dos principais constituintes das amostras. As amostras obtidas no final do processo de lise aplicado são mais simples, uma vez que resultam de um passo adicional de pré-purificação utilizando as colunas comerciais do kit da Qiagen que permite a eliminação de algumas impurezas como o gDNA e o RNA. Estas amostras vão ser injetadas nos discos monolíticos, após alguns passos de clarificação e concentração, e o facto de serem mais simples é vantajoso visto que assim existe um menor número de espécies a interagir com os ligandos do monolito facilitando o processo de separação e consequente purificação da isoforma sc do mcDNA.

Comparando a eletroforese da fase de produção do plasmídeo com a fase de indução do mcDNA verifica-se que a primeira é muito mais simples e tem presente um menor número de espécies. A amostra resultante da indução apresenta maior variedade de espécies visto que a

recombinação não é totalmente eficiente e assim, existem moléculas residuais de PP e de mP juntamente com o mcDNA. A complexidade da amostra obtida no final da indução é um dos fatores que dificulta a purificação do mcDNA, visto que comparativamente aos plasmídeos convencionais, neste caso existe uma variedade maior de espécies a interagir com os ligandos imobilizados no monolito.

4.2. Extração do mcDNA

Realizado o processo de produção, foi necessário proceder à lise alcalina de forma a obter o mcDNA. Este passo de recuperação conjugado com passos de clarificação e concentração são essenciais para as etapas posteriores de purificação, visto que permitem a eliminação de algumas impurezas, permitindo assim a obtenção de uma amostra menos complexa para aplicação nos ensaios cromatográficos.

Durante a lise é promovido o rompimento da membrana celular utilizando um tampão que contém NaOH e um detergente iónico (dodecil sulfato de sódio) com um pH superior a 12,5. Após a lise, realiza-se um passo de neutralização para garantir apenas a desnaturação do gDNA, mantendo a estabilidade e integridade do mcDNA. O processo de lise foi realizado com recurso a um kit comercial que contém também umas colunas de purificação usadas para a eliminação de algumas espécies contaminantes. Em particular, neste caso foram utilizadas colunas de troca iónica, que contêm aminas carregadas positivamente de modo a interagirem com os grupos fosfato do DNA, carregados negativamente. A estas colunas são adicionados tampões de lavagem e eluição que contêm NaCl que possibilitam a eluição das espécies por ordem crescente da intensidade da interação.

No protocolo inicial do *Kit da Qiagen* para aplicação em plasmídeos convencionais, os tampões de lavagem e de eluição aplicados nas colunas de purificação têm uma concentração de 1 M e 1,25 M, respetivamente. No entanto, dado que se trata de uma amostra de mcDNA foram necessárias algumas alterações nestas concentrações. Caso se utilizassem as mesmas concentrações recomendadas pelo Kit, observava-se perda da biomolécula de interesse nos passos de lavagem. Então, após algumas otimizações realizadas pelo grupo, concluiu-se que as melhores concentrações para os tampões de lavagem e eluição a usar, de modo a perder o mínimo de biomolécula de interesse e a obter uma amostra final com a mínima quantidade de contaminantes, são de 0,9 M e 1,75 M de NaCl, respetivamente. Aplicando as condições descritas foi possível obter uma amostra final sem a presença de RNA acompanhada de uma maior proporção da isoforma sc do mcDNA comparativamente aos restantes contaminantes presentes na amostra final obtida. Este resultado pode ser observado no segundo poço representado na eletroforese da figura 19. Relativamente à amostra de mcDNA Small foi também necessário efetuar alterações, como tal, concluiu-se que a melhor concentração a aplicar no tampão de lavagem é de 0,30 M de NaCl. A concentração do tampão de eluição utilizada foi a mesma (1,75 M de NaCl). Durante o processo de otimização, observou-se que

para concentrações mais elevadas ocorria perda da biomolécula de interesse nos passos de aplicação do tampão de lavagem, daí a necessidade de diminuição da concentração relativamente à amostra de mcDNA. Estas alterações ao protocolo inicial do *Kit da Qiagen* foram necessárias visto que se trata de uma amostra de menores dimensões, e como tal estabelecem-se interações com outro tipo de intensidade que alteram o padrão de eluição. Esta alteração pode dever-se à diferente distribuição de cargas à superfície por causa de se tratar de uma biomolécula de menores dimensões. Tendo em consideração esta alteração da intensidade das interações estabelecidas, foi necessário o ajuste descrito dos tampões de lavagem e eluição do modo a não comprometer a pré-purificação nas colunas do *kit*, isto é, de modo a obter uma amostra final com o máximo de mcDNA na isoforma sc acompanhado da presença mínima de contaminantes.

A eletroforese das amostras obtidas pode observar-se na figura 10, estando apresentadas as amostras pela seguinte ordem: PP, mcDNA, PP Small e mcDNA Small. Na eletroforese é possível observar que os plasmídeos originais têm sempre um padrão de migração menor relativamente ao mcDNA correspondente, o que se deve ao menor tamanho do mcDNA. Na eletroforese também se pode confirmar a complexidade associada a este tipo de amostra visto que nas amostras de mcDNA e mcDNA Small estão presentes maior número de bandas. Como já foi referido, isto acontece porque a recombinação não é total, havendo sempre presença residual de PP, assim como de mP que não foi digerido na totalidade. A identidade das diversas isoformas também foi analisada através da realização de digestões enzimáticas em que foram selecionadas enzimas de restrição que cortam em sítios estratégicos.

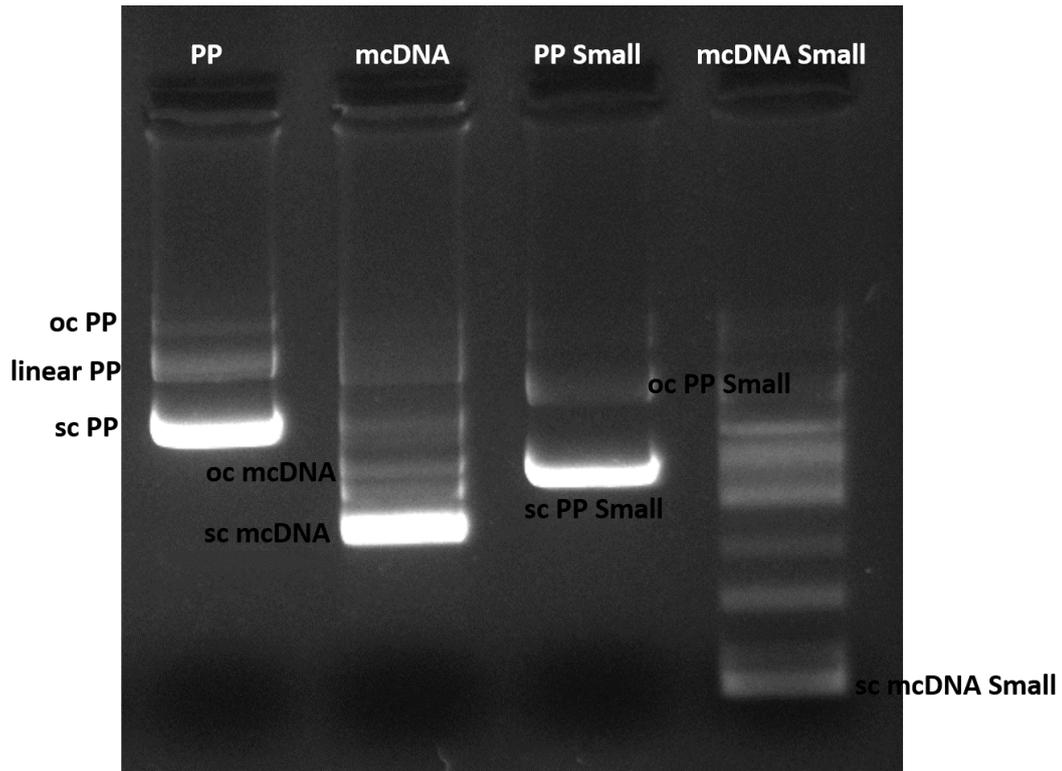


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas da lise alcalina e pré-purificação utilizando o Kit da Qiagen. Em cada poço podem observar-se as amostras obtidas antes e após a indução para a produção do mcDNA. Nos dois primeiros poços observam-se as amostras relativas ao plasmídeo utilizado de maiores dimensões, e nos dois últimos poços, está representado o plasmídeo de menores dimensões, com ausência do gene GFP.

A identidade das isoformas evidenciadas na eletroforese de agarose da figura 10 foi confirmada através de diversas digestões enzimáticas que se encontram descritas na próxima secção. Importante é também referir que neste tipo de amostra, mais complexa, por vezes se encontram algumas bandas não identificadas que podem corresponder a moléculas de mP, que resultam do processo de recombinação incompleto e permanecem como contaminantes.

4.3. Digestão Enzimática

De modo a confirmar a identidade das espécies obtidas após a produção e recuperação ou pré-purificação foram realizadas algumas digestões enzimáticas com enzimas específicas, nomeadamente a Nde I, a BamH I e a EcoR I. As digestões decorreram durante uma hora a 37°C, e foram utilizadas amostras de mcDNA e de PP. Foi também testada uma possível influência da quantidade de amostra na eficácia da digestão enzimática, assim sendo, foram utilizadas 1µg e 2 µg de mcDNA e de PP.

Na figura 11 pode observar-se o mapa do PP que origina o mcDNA. Neste mapa é possível observar com maior detalhe os dois locais de corte da endonuclease Sce I que atua no processo de recombinação, do qual resultam o mP e o mcDNA. O mP contém os elementos necessários para a produção na unidade bacteriana, nomeadamente o gene de resistência à canamicina e a origem de replicação. Por outro lado, o mcDNA é constituído pelo promotor CMV7 e o local de múltipla clonagem (MCS) onde se pode inserir o gene terapêutico, como representado na figura 11. Nesta figura são também observados os locais de corte das enzimas de restrição utilizadas, sendo estas a Nde I, BamH I e EcoR I. A Nde I corta uma sequência específica que se encontra na região correspondente ao mP, a BamH I e a EcoR I atuam em sequências específicas integrantes do mcDNA.

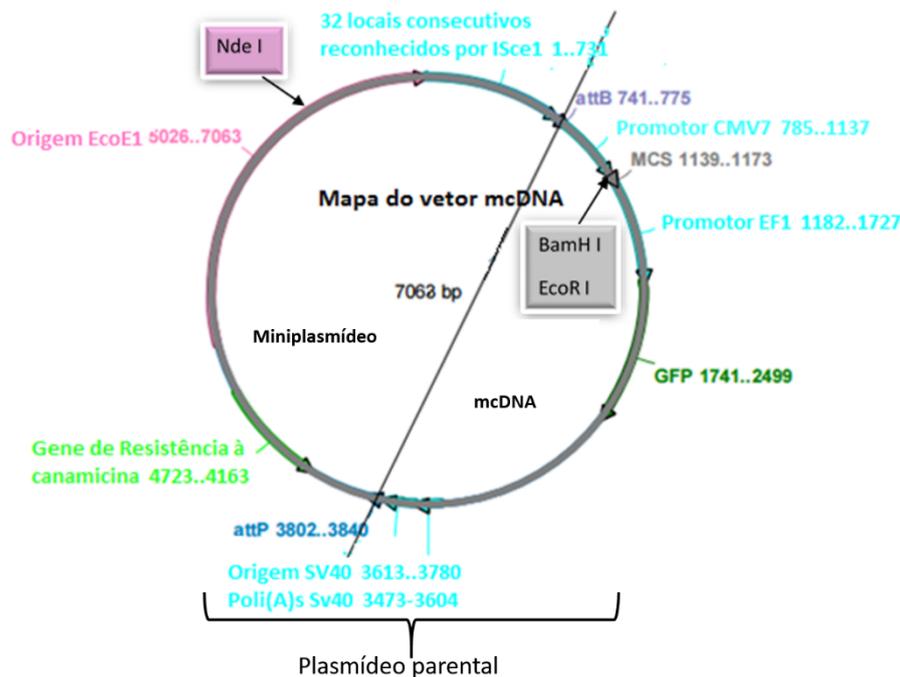


Figura 11 - Mapa do PP que origina o mcDNA. No mapa representado podem observar-se os locais reconhecidos pela endonuclease Sce I, dos quais resultam o mcDNA e o mP. Pode observar-se que a fração correspondente ao mP é constituída pelos elementos necessários para a replicação no hospedeiro bacteriano, ao passo que, o mcDNA é constituído pelos genes necessários à expressão eucariota assim como o gene repórter da proteína fluorescente verde (GFP). Estão também representados os locais reconhecíveis pelas enzimas de restrição Nde I, BamH I e EcoR I. A Nde I reconhece uma sequência apenas presente no mP ao passo que a BamH I e a EcoR I reconhecem sequências presentes no mcDNA. Estes diferentes locais de reconhecimento vão alterar o padrão de linearização que as enzimas de restrição promovem e permitir a identificação das diversas isoformas obtidas na amostra da lise.

Quando o PP é sujeito à digestão enzimática com qualquer uma das três enzimas usadas neste estudo será de esperar que ocorra linearização de todos os componentes presentes na amostra, visto que o PP contém as sequências alvo de cada uma das enzimas de restrição. Neste caso, e uma vez que a amostra não foi sujeita à indução, estão apenas presentes as diferentes isoformas de PP e todas serão digeridas e linearizadas com qualquer uma destas enzimas. Na figura 12,

pode observar-se um esquema do comportamento do PP quando sujeito à ação das enzimas de restrição

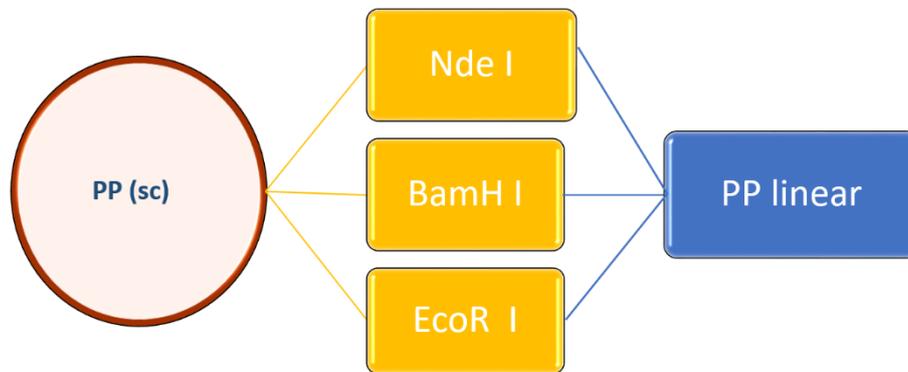


Figura 12 - Esquema representativo da ação das enzimas de restrição Nde I, BamH I e EcoR I no PP.

Por outro lado, quando se realiza a digestão enzimática com as enzimas de restrição acima enunciadas numa amostra que resulta da indução, os resultados já vão ser mais diversificados visto que a amostra é mais complexa e tem uma maior diversidade de biomoléculas, nomeadamente as isoformas de PP e de mcDNA. Como já foi referido, a enzima de restrição Nde I atua numa sequência unicamente presente no mP, logo, será de esperar que não ocorra linearização de nenhuma das isoformas do mcDNA. Por outro lado, quando se realiza uma digestão enzimática da amostra contendo mcDNA com as enzimas de restrição BamH I e EcoR I já se espera que ocorra linearização da amostra visto que este é constituído por uma sequência reconhecida por estas enzimas de restrição. A figura 13 esquematiza a ação das enzimas de restrição nas amostras indicadas. Neste processo é igualmente importante considerar que quando se produz o mcDNA a conversão nunca é total, havendo sempre presença de PP e mP juntamente com o mcDNA. Nesta situação, o PP sofrerá linearização sob a ação das três enzimas de restrição, pela mesma lógica esquematizada na figura 12, enquanto o mP só sofrerá linearização na presença da enzima de restrição Nde I.

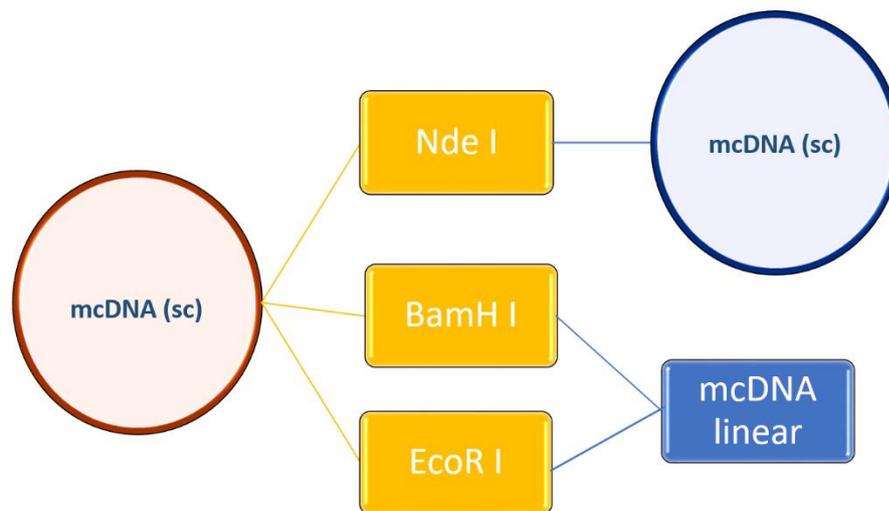


Figura 13 - Esquema da ação das enzimas de restrição Nde I, BamH I e EcoR I no mcDNA.

Após a realização das digestões enzimáticas com as enzimas de restrição Nde I, BamH I e EcoR I nas amostras de PP e mcDNA, analisaram-se os resultados através de eletroforese (figura 14).

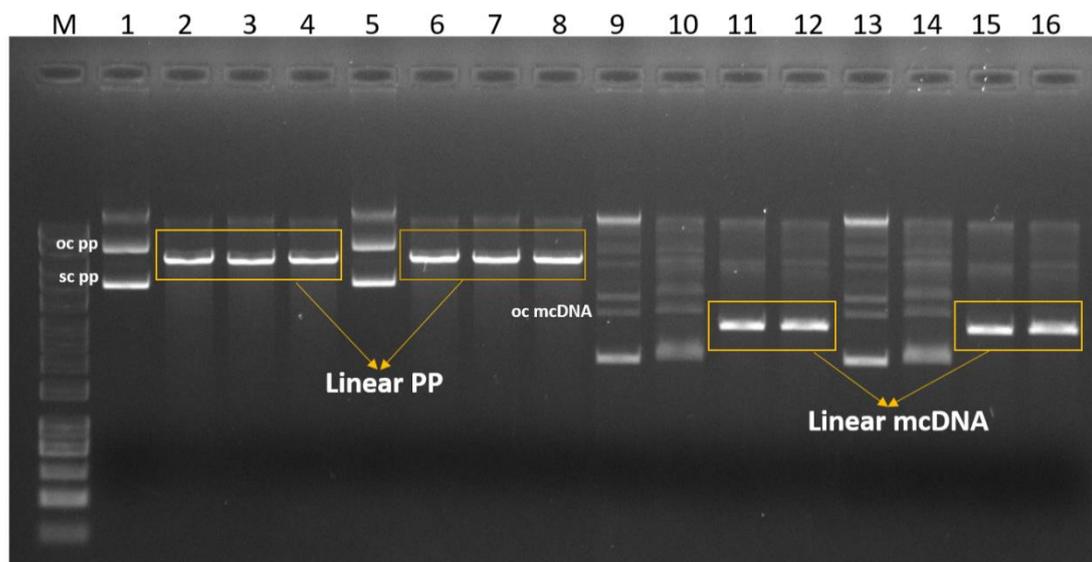


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas nas digestões enzimáticas. M: marcador; Linha 1: Amostra de PP; Linhas 2, 3, 4: digestão enzimática da amostra de PP (1 µg) com as enzimas de restrição, Nde I, BamH I, EcoR I, respetivamente; Linha 5: Amostra de PP; Linhas 6, 7, 8: digestão enzimática numa amostra de PP (2 µg) com as enzimas de restrição, Nde I, BamH I, EcoR I, respetivamente; Linha 9: Amostra de mcDNA; Linhas 10, 11, 12: digestão enzimática numa amostra de mcDNA (1 µg) com as enzimas de restrição, Nde I, BamH I, EcoR I, respetivamente; Linha 13: Amostra de mcDNA; Linhas 14, 15, 16: digestão enzimática numa amostra de mcDNA (2 µg) com as enzimas de restrição, Nde I, BamH I, EcoR I, respetivamente.

Como já foi referido, nas digestões enzimáticas realizadas com a amostra de PP, espera-se que todas as isoformas sofram linearização pela ação de qualquer uma das enzimas de restrição em

estudo. Nas linhas 2,3,4,6,7 e 8 da figura 14 pode observar-se que, de facto, estes foram os resultados obtidos, visto que todas as isoformas de PP linearizaram observando-se uma banda mais intensa, corresponde à isoforma linear. Na amostra de PP da linha 1 comprova-se assim a presença de uma banda com menor migração corresponde à isoforma oc e a banda que migra mais corresponderá à isoforma sc. Pode também deduzir-se que a quantidade de amostra não teve influência nos resultados obtidos, uma vez que foi observada a linearização da amostra para os ensaios com 1 µg e 2 µg.

Relativamente às digestões enzimáticas realizadas com a amostra sujeita à indução e que já contém mcDNA, os resultados esperados já divergem um pouco dos anteriores, visto que esta amostra é um pouco mais complexa. O mcDNA só possui sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição BamH I e EcoR I, por isso é de esperar que ocorra linearização apenas sob ação destas duas enzimas de restrição. Estes resultados estão evidenciados nas linhas 11, 12, 15 e 16 da figura 14 onde se pode observar uma banda com maior intensidade, correspondente à isoforma linear do mcDNA. Neste caso, pode observar-se que na amostra inicial apenas estão presentes as isoformas sc e oc do mcDNA, visto que nesta não existe nenhuma banda com o peso molecular evidenciado nas linhas 11, 12, 15 e 16. Também se pode observar uma linearização das bandas correspondentes ao PP, visto que, como já foi referido, o PP contém todas as sequências a serem reconhecidas nestes ensaios.

Por outro lado, a enzima de restrição Nde I apenas reconhece uma sequência existente no mP, pelo que será de esperar que não ocorra linearização de nenhuma das isoformas correspondentes ao mcDNA. Estes resultados estão evidenciados nas linhas 10 e 14 onde se pode observar a presença das duas isoformas presentes na amostra do mcDNA (sc e oc) o que indica que não houve linearização. Mais uma vez não se observou influência da quantidade de amostra inicial utilizada no resultado final. Com estes resultados pode confirmar-se a que isoforma corresponde cada banda obtida no gel de eletroforese, facilitando as posteriores identificações e análise de resultados.

4.4. Estratégias de Purificação

4.4.1. Monolito de histamina para a purificação de mcDNA

Numa primeira abordagem foi usado o monolito de histamina para estudar as interações que são promovidas com as diferentes espécies de ácidos nucleicos presentes na amostra, incluindo o mcDNA, e avaliar a possibilidade de estabelecer uma estratégia de purificação. Na literatura está já descrita a aplicação deste monolito para a purificação de pDNA [30,52], tendo-se verificado nesse caso uma menor interação com a isoforma oc, eluindo a sc mais tardiamente, usando como sal o NaCl ou sulfato de amónio em diferentes estratégias de eluição. No caso do NaCl, foi estabelecido um gradiente por passos crescente de 20% e 75% de 3 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris a pH 8. Para o sulfato de amónio foi estabelecido um gradiente por passos decrescente de 63% e 0% de 3M de sulfato de amónio em 10 mM de tampão Tris a pH 8. Optou-

se pela estratégia que usa um gradiente crescente de NaCl de modo a evitar o impacto ambiental do sulfato de amónio. Para a utilização deste monolito no presente estudo foram considerados alguns pontos essenciais, nomeadamente, o pH (atendendo ao pKa da histamina de 7,05 a 25°C [52]) e o tipo de sal utilizado na eluição, que são fatores que podem afetar grandemente o tipo de interações estabelecidas. Inicialmente foi testada a utilização de cloreto de sódio, visto que está descrito como apresentando menos implicações ambientais comparativamente ao sulfato de amónio. Relativamente ao pH, e tendo em consideração que o pKa da histamina é de 7,05, foi estabelecido um intervalo de valores inferiores ao pKa de modo a induzir uma carga positiva nos ligandos e assim promover interações eletrostáticas com o DNA, carregado negativamente. Os valores de pH estudados foram 7 e 6, sendo que não se optou pelo estudo de valores inferiores devido a uma possível degradação do DNA a valores de pH muito baixos. O gradiente testado inicialmente foi um gradiente linear de 0 M a 3 M de NaCl em tampão Tris-HCl a pH 7, durante 10 minutos, onde foi possível observar que a 0 M não ocorre eluição de nenhuma espécie, confirmando a capacidade do ligando estabelecer interações com a amostra injetada (resultados não apresentados). Neste ensaio inicial verificou-se a eluição da amostra quando o gradiente apresentava um valor de aproximadamente 0,84 M de sal, sendo um resultado a considerar na definição de novos ensaios teste. Assim, seguidamente, foram testados diversos gradientes por passos tendo em conta a concentração de sal que promoveu a eluição da amostra (0,84 M), tendo sido também definidos diferentes valores de pH. Os resultados obtidos revelaram que nestas condições o monolito não apresentou seletividade para nenhuma das espécies presentes, sendo que ocorreu eluição em igual proporção nos diversos picos. A figura 15 representa uma eletroforese de um ensaio em que se pode observar este fenómeno. Contudo, no último pico correspondente a este ensaio observa-se uma eluição muito ténue da isoforma sc do mcdNA juntamente com a banda de maior peso molecular. Contudo, este resultado não é muito promissor visto que a proporção de mcdNA é muito reduzida relativamente à quantidade que elui juntamente com outras espécies no pico anterior. Para além disso, foram realizados outros ensaios numa tentativa de melhorar a seletividade tendo em conta estes resultados, no entanto não se obtiveram resultados satisfatórios. Nos estudos descritos anteriormente da aplicação deste monolito na purificação de pDNA observou-se de igual modo uma preferência da isoforma sc havendo uma eluição mais tardia da mesma. Esta preferência deve-se à maior exposição das bases desta isoforma, devido à torção sofrida pela cadeia no fenómeno de superenrolamento, que assim permite estabelecer outro tipo de interações entre o pDNA e o ligando de histamina, aumentando assim o seu tempo de retenção. O ligando de histamina tem a capacidade de desenvolver diversos tipos de interações com as biomoléculas injetadas. A um pH inferior a 7 o anel de imidazol encontra-se protonado havendo assim presença de catiões que conseguem promover interações catião- π e interações eletrostáticas. Para além disso, são também promovidas interações por pontes de hidrogénio e interações hidrogénio- π [30].

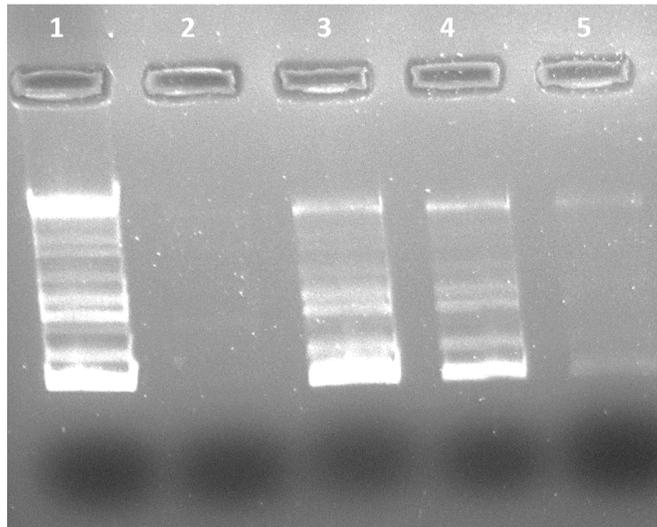


Figura 15 - Eletroforese de agarose com a análise das frações recolhidas dos picos obtidos no ensaio relativo à injeção de uma amostra contendo mcDNA no monolito de histamina. No ensaio foi aplicado um gradiente por passos, tendo o passo de ligação ausência de sal, seguido de passos com as concentrações 0,51 M, 0,75 M, e 1,5 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl. Linha 1: Amostra inicial; Linha 2: Fração correspondente ao primeiro passo; Linha 3: Fração correspondente ao segundo passo; Linha 4: Fração correspondente ao terceiro passo; Linha 5: Fração correspondentes ao quarto passo. Este resultado confirmou a possibilidade do ligando histamina estabelecer ligação com todas espécies presentes na amostra inicial, sendo possível recuperar a amostra ao longo do gradiente. Contudo, o monolito não apresentou capacidade para estabelecer seletividade suficiente para a obtenção de mcDNA isolado.

Visto que com a estratégia anterior não foi possível obter uma separação eficiente da isoforma sc do mcDNA, de seguida, foi utilizado o mesmo suporte, mas com aplicação de um gradiente decrescente de sulfato de amónio que favorece maioritariamente interações hidrofóbicas. Nesta estratégia o ensaio é iniciado na presença de sal, para promover a ligação da amostra injetada aos ligandos de histamina, e de seguida, a concentração do sulfato de amónio é gradualmente diminuída, de modo a promover a eluição gradual das biomoléculas que se encontram ligadas ao monolito. Contudo, neste trabalho, não foi possível estabelecer um passo inicial em que se observasse total retenção do mcDNA ao suporte, mesmo quando o ensaio foi iniciado com uma concentração de 3 M de sulfato de amónio em 10 mM de tampão Tris-HCl. A estratégia para promover a total retenção da amostra, passaria por aumentar a concentração de sulfato de amónio no passo de equilíbrio. No entanto, foi decidido não avançar com esta abordagem uma vez que aumentar a concentração para além de 3 M de sulfato de amónio já poderia induzir alguma destabilização/agregação na amostra injetada, para além de poder comprometer a aplicação do método, considerando o impacto ambiental associado à utilização de uma elevada concentração deste sal. Assim sendo, foi concluído que esta estratégia não seria viável visto que se perde uma grande quantidade de amostra, comprometendo-se o rendimento.

Apesar de não ter sido possível estabelecer uma estratégia de purificação com sulfato de amónio no monolito de histamina pode afirmar-se que ocorreram interações entre a amostra injetada e este ligando, visto que houve retenção parcial da amostra num passo inicial e eluição posterior em diversos passos. Em estudos anteriormente realizados por Sousa e colaboradores

utilizando a histidina como ligando observou-se que este aminoácido promove preferencialmente interações hidrofóbicas com o pDNA, tendo-se desenvolvido uma estratégia de purificação da isoforma sc do pDNA através da aplicação de um gradiente por passos decrescente de sulfato de amônio entre 2,3 M e 2 M [31]. De um modo semelhante ao trabalho aqui descrito, neste estudo com a histidina observou-se uma preferência pela interação com as moléculas cujas bases estão mais expostas. Nesta estratégia observou-se maior retenção da isoforma sc comparativamente à oc devido à presença de interações ring-stacking que ocorrem preferencialmente com as bases mais expostas desta isoforma. Neste estudo concluiu-se que o tipo de interações prevalentes entre a histidina e o pDNA são interações ring staking/interações hidrofóbicas visto que não se verificou um enfraquecimento das interações por pontes hidrogênio com o aumento da concentração de sal. Embora estas interações também possam ser estabelecidas com o ligando de histamina na presença de sulfato de amônio, a estratégia de eluição que se mostrou mais relevante no presente trabalho foi a de gradiente crescente com NaCl. Dado que a histamina é resultante da descarboxilação do aminoácido de histidina [52], a ausência do grupo carboxilo conferiu uma versatilidade ao ligando de histamina podendo explorar condições de eluição iônicas com os ácidos nucleicos. O mesmo não é possível com o ligando de histidina devido à repulsão que o grupo carboxilo exerce sobre os grupos fosfato dos ácidos nucleicos [31].

4.4.2. Monolito de agmatina para a purificação de mcDNA

Optou-se por realizar também um estudo do monolito de agmatina com a amostra pré-purificada de mcDNA, no sentido de estudar o tipo de interações envolvidas e de estabelecer uma estratégia de purificação do mcDNA visto que com o monolito anterior não se conseguiram obter os resultados pretendidos. O monolito de agmatina também já foi aplicado com sucesso na purificação de pDNA em alguns trabalhos descritos na literatura [30,55]. Nesses estudos foram testados diversos valores de pH (5-10) tendo em conta que o pKa deste ligando é $> 12,5$ [30,55]. Os resultados obtidos revelaram que para o mesmo gradiente de eluição com NaCl há aumento de tempos de retenção para os valores mais baixos de pH [30]. Este comportamento foi justificado pela intensificação das interações eletrostáticas, interações catião- π e pontes de hidrogênio para ambientes mais ácidos. Neste estudo também se observou uma preferência do ligando para com a isoforma sc, o que se deve de igual modo à maior exposição das bases característica desta isoforma que permite uma intensificação das interações estabelecidas aumentando assim o tempo de retenção. Foi também definida uma estratégia de purificação com utilização de sulfato de amônio, no entanto, mais uma vez é preferível a utilização de NaCl dado o menor comprometimento ambiental [30]. De um modo geral, dos estudos realizados para o pDNA quer com o ligando de histamina quer com o ligando de agmatina, foi concluído que a ausência do grupo carboxilo possibilita explorar condições iônicas e intensificar essas interações quando comparado com os ligandos de histidina e arginina. Pensa-se que esta descarboxilação diminui as repulsões que ocorrem e intensifica outro tipo de interações não covalentes, aumentando assim o tempo de retenção. Estes resultados estão de acordo com

estudos anteriores em que se conseguiu estabelecer uma estratégia de purificação do pDNA com o ligando de arginina numa concentração máxima de 300 mM de NaCl [31], valor muito inferior ao obtido neste estudo (2,7M). Tendo em conta a versatilidade do monolito de agmatina, no presente trabalho foi realizado um estudo deste monolito com o intuito de explorar o bioreconhecimento do mcDNA pelo ligando de agmatina de modo a que se pudesse tirar vantagem destas interações para a purificação da isoforma sc do mcDNA.

A agmatina, a 25°C tem um $pK_a > 12,5$, por isso, ao longo deste estudo, trabalhou-se sempre com valores de pH inferiores de modo a que a carga do ligando fosse positiva e assim houvesse interação com a carga negativa do DNA conferida pelos grupos fosfato. O estudo foi iniciado com um pH de 8, aplicando um gradiente linear de 0 M a 3 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl, com o intuito de observar o comportamento de ligação/eluição da amostra inicial quando injetada no monolito de agmatina. Com estas condições verificou-se inicialmente a retenção total da amostra e posterior eluição das espécies ligadas a uma concentração de 2 M de NaCl. Posteriormente, de modo a observar a influência do pH no comportamento cromatográfico, foram realizados ensaios com valores de pH de 8, 7 e 6. A concentração de sal aplicada no passo de ligação foi definida pelo comportamento observado no screening efetuado inicialmente. Na figura 16 podem ser observados os diversos cromatogramas obtidos neste estudo.

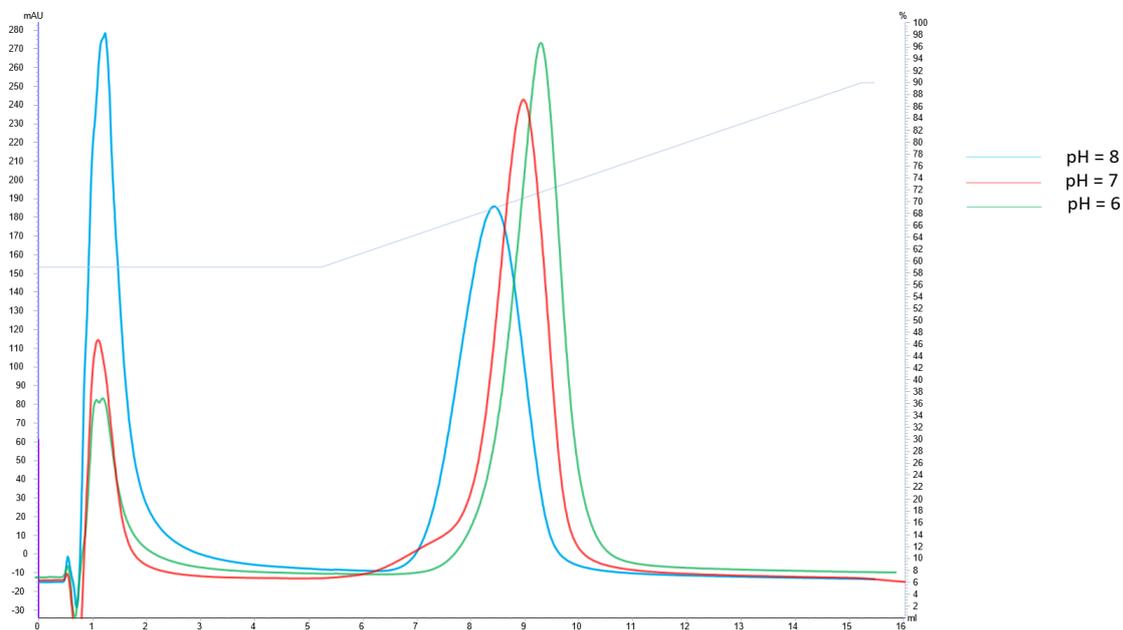


Figura 16 - Perfis cromatográficos obtidos após injeção da amostra contendo mcDNA no suporte de agmatina, usando o tampão 10 mM Tris-HCl a pH 6, 7 e 8. O ensaio iniciou-se com uma concentração de 1,8 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl, promovendo de seguida um gradiente linear até 2,7 M de NaCl durante 10 minutos.

Na figura 16, é possível observar que para valores de pH superiores maior a altura do pico obtido no primeiro passo, indicando a menor retenção de espécies, e, por conseguinte, menor a altura do pico correspondente ao segundo passo, obtido no gradiente linear. A análise dos cromatogramas revela também que a eluição ao longo do gradiente depende do pH usado, sendo que para menores valores de pH se verifica um tempo de retenção maior para as espécies ligadas. De forma geral, conclui-se que a retenção aumenta com a diminuição do pH usado no tampão. Este comportamento pode ser devido à intensificação da carga positiva que a agmatina adquire com valores de pH mais baixos, sendo promovida uma interação mais forte com a carga negativa do DNA. Estes resultados vão de encontro aos que já foram descritos no início do presente subcapítulo onde Sousa e colaboradores estudaram os mecanismos de retenção do monolito de agmatina. Neste estudo observou-se de igual modo que valores de pH inferiores promovem maior tempo de retenção, provavelmente devido à intensificação da carga que resulta no estabelecimento de interações mais intensas. No presente trabalho foram estudados valores de pH entre 6 e 8, no entanto, mesmo sendo um intervalo mais reduzido do que os valores usados (pH entre 5 e 10) no estudo desenvolvido por Sousa e colaboradores, observou-se o mesmo comportamento de aumento do tempo de retenção com diminuição do pH [30]. Importante reforçar que com a diminuição do pH há uma intensificação das interações estabelecidas, sendo estas maioritariamente interações eletrostáticas, interações catião- π , pontes de hidrogénio e interações hidrogénio- π . Com o conjunto de ensaios anteriormente descritos é possível concluir que para valores de pH inferiores observa-se uma maior capacidade de retenção por parte do monolito, o que indica que nestes valores de pH será necessário aplicar maior quantidade de sal de modo a promover a eluição das biomoléculas retidas. Após a avaliação da retenção, é essencial verificar a seletividade para o mcDNA. Com este objetivo foi realizada uma eletroforese em gel de agarose de cada um dos picos dos cromatogramas apresentados na figura anterior, para os respetivos valores de pH em estudo.

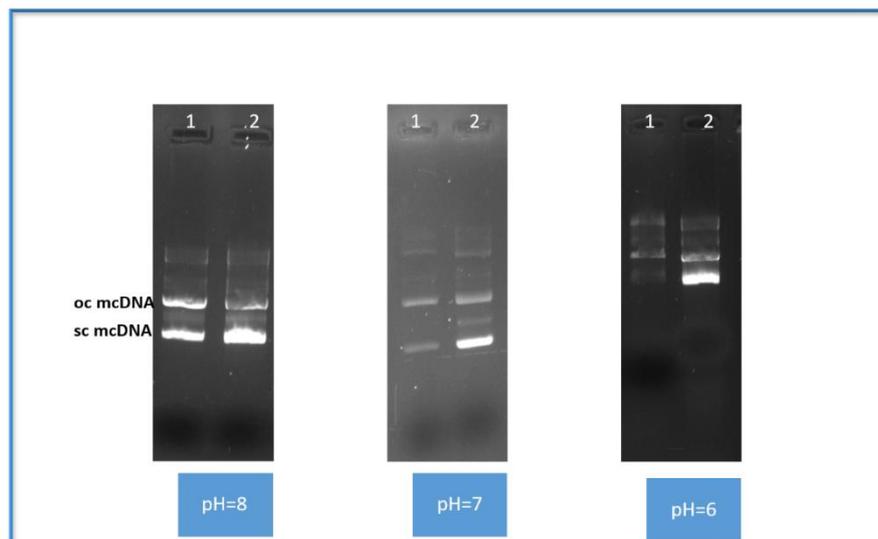


Figura 17 - Eletroforese representativa das espécies eluídas nos ensaios de pH, representados nos cromatogramas da figura 16. Poço 1: pico obtido para uma concentração de 1,8 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl; Poço 2: pico obtido no gradiente linear de 1,8 M de NaCl até 2,7 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl durante 10 minutos, para os ensaios de pH 8, 7 e 6.

Tal como discutido anteriormente, também nas eletroforeses da figura 17 se comprova que para valores de pH superiores se observa uma maior eluição da amostra no primeiro passo, ou seja, uma menor capacidade de retenção do monolito. No ensaio realizado a pH 8 observa-se que a amostra elui de igual modo nos dois picos apresentados, não havendo seletividade para nenhuma das espécies. Por outro lado, no ensaio com pH 7, observa-se uma menor perda da isoforma sc do mcDNA, e a pH 6 a perda de sc mcDNA é ainda menor acompanhada de uma preferência pela isoforma oc do mcDNA no primeiro passo e pela isoforma sc do mcDNA no segundo passo. Esta preferência do ligando de agmatina pela isoforma sc do mcDNA comparativamente ao oc deve-se à sua estrutura muito característica. A isoforma sc é caracterizada por ser mais compacta o que lhe confere uma maior densidade de carga por área de superfície havendo assim uma intensificação das interações eletrostáticas. Para além disso, esta isoforma apresenta uma maior exposição das bases, favorecendo-se para além de interações catião- π , também a interação por pontes de hidrogénio uma vez que as aminas carregadas conseguem interagir preferencialmente com as guaninas [30,31,52]. Estes resultados estão em concordância com os descritos na literatura de aplicação deste monolito numa amostra de pDNA onde se enfatiza a maior retenção por parte do monolito para valores de pH inferiores [30]. Considerando os resultados apresentados, e conjugando com informação recolhida de outros ensaios realizados com diferentes gradientes, optou-se pela utilização do tampão a pH 6.

Dadas as conclusões apresentadas anteriormente, de seguida tentou-se estabelecer um gradiente por passos com NaCl na estratégia de eluição, usando pH 6. Como já se tinha verificado que a 1,8 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl não se perdia sc mcDNA, a estratégia definida passou por aumentar a concentração de sal neste passo de modo a promover uma eluição preferencial do oc mcDNA no passo de ligação e da biomolécula de interesse num passo posterior. No entanto, não foi possível estabelecer condições que permitissem uma separação total e eficaz destas biomoléculas, pois a 1,9 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl começou a eluir uma parte de sc mcDNA no passo de ligação, acompanhada ainda de eluição de oc mcDNA no passo seguinte, que poderia comprometer quer o rendimento de recuperação quer a pureza do mcDNA. Na figura 18 pode observar-se o cromatograma e a eletroforese do ensaio referido.

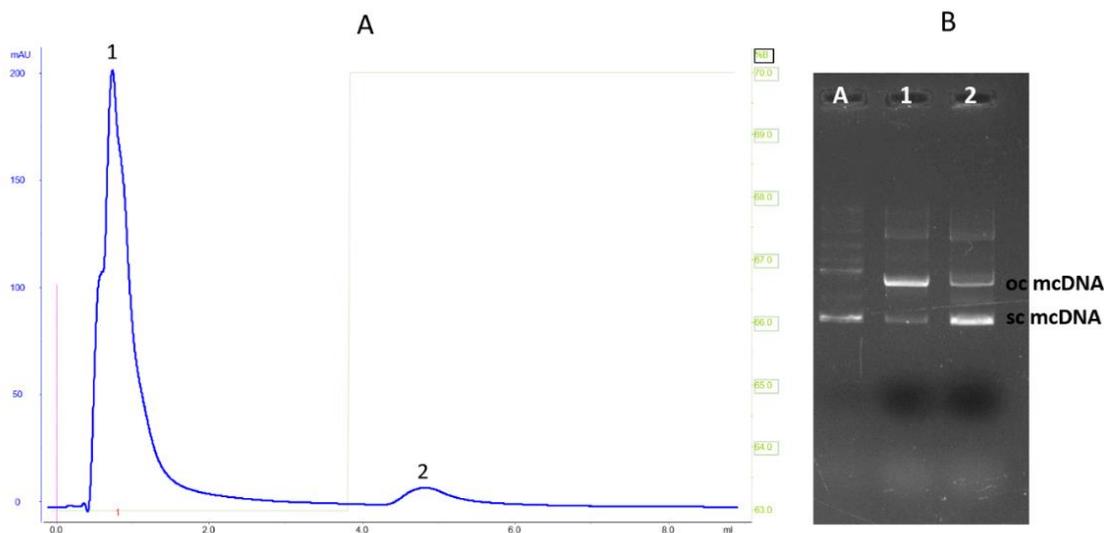


Figura 18 - Cromatograma representativo do estudo efetuado com o monolito de agmatina. Foi aplicado um gradiente por passos, tendo o passo de ligação uma concentração de 1,9 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl e o passo de eluição uma concentração de 2,1 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl. (B) Eletroforese em gel de agarose representativa do cromatograma observado. Poço A: Amostra inicial; Poço 1: fração correspondente ao pico 1; Poço 2: Fração correspondente ao pico 2.

Visto que com a estratégia anterior não foram identificadas condições para atingir a seletividade necessária para garantir a máxima pureza de mcDNA, de seguida foi testada uma abordagem diferente. Assim, os ensaios seguintes foram iniciados sem a presença de sal, de modo a promover a total ligação da amostra injetada ao ligando de agmatina. Deste modo, é previsível que as interações sejam intensificadas uma vez que é promovida a total retenção das biomoléculas presentes na amostra inicial. Por oposição, quando um ensaio é iniciado já com a presença de sal, é provável que algumas interações não se cheguem a estabelecer, pois há uma eluição imediata de determinadas biomoléculas no passo de ligação. Neste contexto foram realizados diversos ensaios, de modo a analisar o comportamento do monolito perante as novas condições testadas. Como tal, os ensaios foram todos iniciados sem a presença de sal, e estabeleceram-se passos posteriores caracterizados pelo aumento da concentração de sal de modo a promover a eluição das biomoléculas. Na tabela 5 está apresentada uma versão resumida de três ensaios realizados, dos quais foi deduzido o melhor conjunto de concentrações a aplicar.

Tabela 5 - Resumo do comportamento de ligação/eluição das isoformas de mcDNA presentes na amostra.

Concentração de NaCl	Biomoléculas presentes	
	oc mcDNA	sc mcDNA
0 M	Retenção	Retenção
0,6 M	Retenção	Retenção
2,25 M	Eluição	Eluição

Concentração de NaCl	Biomoléculas presentes	
	oc mcDNA	sc mcDNA
0 M	Retenção	Retenção
1,74 M	Retenção/Eluição	Retenção/Eluição
3 M	Eluição	Eluição

Concentração de NaCl	Biomoléculas presentes	
	oc mcDNA	sc mcDNA
0 M	Retenção	Retenção
1,5 M	Retenção	Retenção
2,25 M	Eluição	Retenção/Eluição
2,7 M	---	Eluição

Como não era conhecido o comportamento da amostra quando injetada e sujeita a estas novas condições de ligação, foi definida a aplicação de um segundo passo com uma concentração de sal intermédia, seguida de um terceiro passo com aumento da concentração. Seria de esperar, que não ocorresse eluição da amostra para concentrações mais baixas, pois, quando se inicia o ensaio sem a presença de sal, a ligação das biomoléculas ao ligando de agmatina intensifica-se, o que pode resultar na eluição mais tardia e para concentrações de sal superiores. De facto, como se pode verificar na tabela 5, para uma concentração de 0,6 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl não se verifica qualquer tipo de eluição. Noutro ensaio, verificou-se também que para 1,5 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl não ocorre eluição de nenhuma das biomoléculas ligadas ao suporte de agmatina. No segundo ensaio descrito na tabela 5, foi aplicado um segundo passo com uma concentração de 1,74 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl, uma concentração superior relativamente ao ensaio anteriormente descrito, de modo a tentar obter a eluição de alguns contaminantes. Neste ensaio, e para esta concentração de sal, já foi observada a eluição das biomoléculas presentes na amostra inicial, no entanto, não foi possível estabelecer um passo em que se observasse apenas a eluição da biomolécula de interesse, pois, num terceiro passo com uma concentração de 3 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl houve igualmente eluição das diversas biomoléculas. Numa terceira estratégia, a concentração de sal do penúltimo passo foi aumentada para 2,25 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl. No primeiro ensaio aqui descrito, já tinha sido observado que para esta concentração de sal ocorria eluição das diversas biomoléculas presentes na amostra inicial, no entanto, foi ainda aplicado um passo posterior para verificar se ainda ocorreria eluição de

algumas biomoléculas que pudessem ter ficado retidas preferencialmente no monolito. Então, quando foi aplicada uma concentração de 2,7 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl, foi observada uma eluição preferencial da isoforma sc do mcDNA, que é a biomolécula que se pretende purificar neste trabalho. Pode observar-se que para a purificação da isoforma sc do mcDNA é necessária a aplicação de concentrações de sal relativamente elevadas, o que confirma a capacidade dos derivados de aminoácidos de estabelecerem interações mais intensas[30]. Pensa-se que este comportamento se deve à ausência do grupo carboxilo no ligando de agmatina que por sua vez diminui as repulsões pelos grupos fosfato carregados negativamente dos ácidos nucleicos, intensificando outro tipo de interações não covalentes. De facto, em estudos realizados com a arginina como ligando na purificação de pDNA foi possível alcançar a purificação da isoforma sc do pDNA com uma concentração máxima de 300 mM, ao passo que neste estudo foi necessário aplicar um passo final de 2,7 M de NaCl para a eluição total das espécies presentes na amostra de mcDNA. Na figura 19, pode observar-se o cromatograma e a respetiva eletroforese do último ensaio descrito na tabela 5.

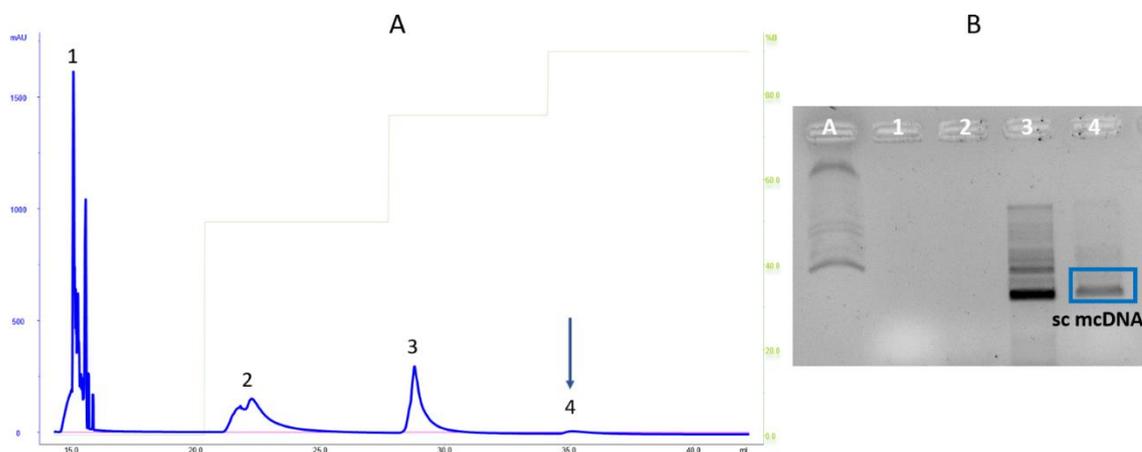


Figura 19 - (A) Cromatograma representativo do estudo efetuado com o monolito de agmatina. (B) Eletroforese em gel de agarose representativa do cromatograma observado. Poço A: Amostra inicial; Poço 1: fração correspondente ao pico 1; Poço 2: Fração correspondente ao pico 2; Poço 3: Fração correspondente ao pico 3; Poço 4: Fração correspondente ao pico 4.

Como se pode observar na eletroforese evidenciada na figura 19, o monolito de agmatina tem capacidade de ligação total da amostra injetada. No pico 3 do cromatograma, correspondente ao poço 3 da eletroforese, eluiu a maior parte da amostra injetada, estando também presente, com alguma intensidade a isoforma de interesse. No pico 4, pode observar-se que a isoforma sc mcDNA eluiu praticamente sem a presença de mais nenhum contaminante, verificando-se apenas um arrastamento muito ténue. Esta estratégia aqui descrita, do ponto de vista do rendimento não é satisfatória, visto que grande parte da isoforma interesse elui no pico 3, juntamente com as restantes biomoléculas. No entanto, analisando sob o ponto de vista de pureza, esta estratégia tem alguma relevância, visto que conseguimos isolar maioritariamente a biomolécula de interesse no último passo do gradiente.

Apesar destes resultados não serem os ideais, visto que é verificada a perda de uma grande quantidade de sc mcDNA, pode considerar-se que relativamente a alguns casos descritos na literatura, esta nova estratégia pode ser considerada uma melhoria em pontos específicos. Por exemplo, Chen e colaboradores desenvolveram uma estratégia de purificação para o sc mcDNA que passava pela utilização de enzimas de restrição, que não será a melhor abordagem considerando uma posterior aplicação a nível industrial [61] e tendo em conta os critérios das agências reguladoras que não permitem a utilização de enzimas de origem animal na obtenção de amostras para aplicação terapêutica. Para além disso, existem estudos desenvolvidos por Mayrhofer que visam a implementação de uma tecnologia mais elaborada, no entanto é necessária a adição prévia de um operão da lactose modificado ao mcDNA de modo a que este contenha uma sequência que reconheça o ligando imobilizado na matriz [66]. O trabalho aqui apresentado ultrapassa esta limitação, visto que, é possível aplicar diretamente a amostra obtida da lise alcalina, sendo esta apenas sujeita a alguns passos de clarificação e concentração prévios. Na literatura, estão também descritos alguns casos de purificação de mcDNA com recurso a interações hidrofóbicas, o que implica a utilização de sulfato de amónio, que pode ter algumas complicações ambientais [64]. Neste caso, a utilização de cloreto de sódio pode ser considerada bastante mais inócua para o ambiente e tolerável do ponto de vista da aplicação.

Em suma, embora a estratégia de purificação desenvolvida com o monolito de agmatina não tenha permitido a recuperação de mcDNA desejada, é importante referir que foi possível um pequeno isolamento do sc mcDNA. Dado que o extrato inicial que contém mcDNA é bastante mais complexo comparativamente aos extratos que contêm pDNA, o processo de purificação pode também tornar-se mais complexo, e por isso novos ensaios e novas condições deverão ser estudadas para otimizar o processo.

4.4.2.1. Monolito de agmatina para a purificação de mcDNA Small

Numa tentativa de demonstrar a aplicabilidade do monolito em estudo a outro tipo de amostras, foi usado um plasmídeo, derivado do plasmídeo original, mas que sofreu uma manipulação para redução de dimensão, devido à clivagem e remoção do gene GFP. Como tal, a primeira estratégia definida envolveu a aplicação do mesmo gradiente testado com o mcDNA. Na figura 20 podem ser observados o cromatograma e a respetiva eletroforese.

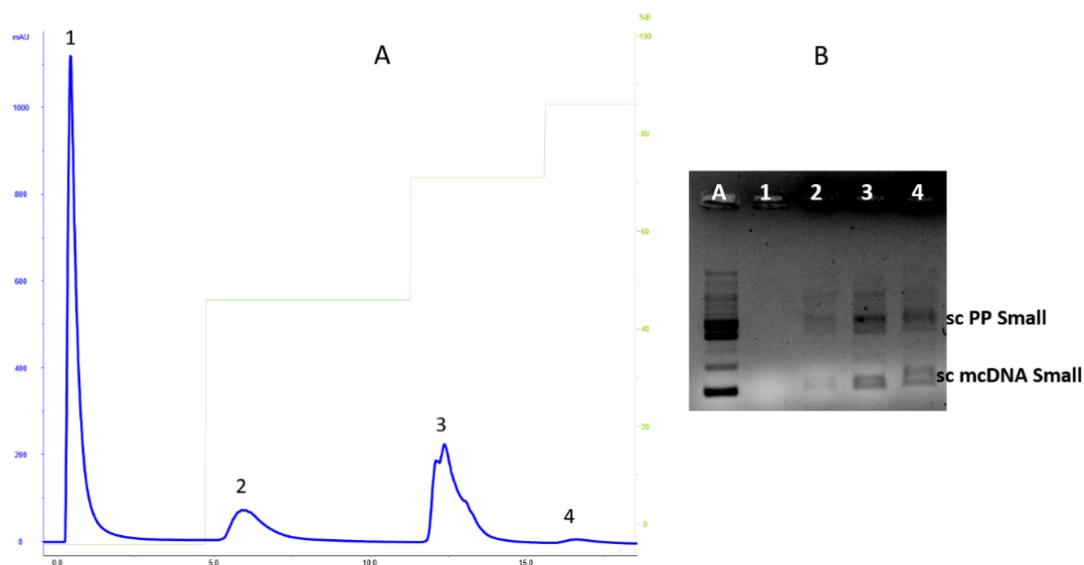


Figura 20 - (A) Cromatograma representativo do estudo efetuado com o monolito de agmatina. Foi aplicado um gradiente por passos, usando concentrações crescentes de NaCl de 0 M, 1,5 M, 2,25 M e 2,7 M de NaCl em 10 mM de tampão Tris-HCl. (B) Eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas do ensaio descrito. Poço A: Amostra inicial; Poço 1: fração correspondente ao pico 1; Poço 2: Fração correspondente ao pico 2; Poço 3: Fração correspondente ao pico 3; Poço 4: Fração correspondente ao pico 4.

Os resultados obtidos indicam que o monolito tem capacidade de retenção total desta nova amostra. No entanto, não se observa qualquer tipo de seletividade para as espécies presentes na amostra, verificando-se uma co-eluição em diversos picos. O resultado foi ligeiramente diferente do obtido com o extrato anterior, o que se deve, muito provavelmente à diferença de tamanhos dos plasmídeos utilizados, que pode estar na base de diferentes tipos de interações que alteram assim o padrão de eluição. Podemos afirmar que moléculas de menores dimensões apresentam menor densidade de cargas negativas, estabelecendo assim interações de menor intensidade. Assim sendo, seria necessário realizar ainda mais estudos e otimizar condições com esta amostra para que pudesse ser efetuada a purificação com utilização deste monolito. Uma das hipóteses começa pela utilização de valores de pH superiores, uma vez que estando sob a influência de uma amostra de menores dimensões a carga total negativa do DNA também é inferior. Consequentemente, haverá uma alteração do padrão de eluição visto que a força das interações é alterada.

Estes ensaios tiveram como objetivo demonstrar a aplicabilidade do mcDNA Small no monolito de agmatina, o que foi concretizado visto que se observa uma retenção total da amostra inicialmente, e uma eluição posterior. Assim sendo, podemos afirmar que o monolito de agmatina testado por ser aplicado a diferentes tipos de amostra de mcDNA, contudo será sempre necessário um ajuste das condições de eluição aplicadas, nomeadamente o pH e a concentração de sal nas diversas etapas dos ensaios cromatográficos. De igual modo, é importante salientar a aplicabilidade deste monolito em diferentes tipos de amostras, nomeadamente o pDNA [30,55] e o mcDNA (descrito ao longo deste estudo). Para que este

monolito possa ser aplicado a diversas amostras é essencial ter um conhecimento do tipo de interações que o ligando de agmatina pode estabelecer com o DNA. Para além do tipo de interações que estabelece, é importante saber em que condições estas ocorrem e de que forma podem ser manipuladas para obter o resultado pretendido. De um modo geral pode concluir-se que este monolito pode ser aplicado a diversos tipos de amostra, nomeadamente o mcDNA. É importante definir estratégias de purificação desta biomolécula visto que a tecnologia de mcDNA é recente e como tal ainda não foi largamente explorada e estudada. Contudo é uma alternativa promissora ao pDNA visto que não tem na sua constituição sequências necessárias para a produção nos hospedeiros bacterianos tendo assim associada uma menor resposta imunitária quando administrado num paciente.

CAPÍTULO 5 - Conclusões e perspectivas futuras

Atualmente, existe uma infinidade de patologias que afetam uma elevada percentagem de pessoas a nível mundial. Os fármacos convencionais não representam uma solução para esta problemática e, como tal, surge uma grande necessidade de desenvolver novos tipos de terapias e fármacos que permitam alcançar uma solução para esta problemática. Neste contexto, surgem a terapia génica e as vacinas de DNA. Estas alternativas promissoras permitem, através da administração de DNA, suprir genes em falta ou deficientes permitindo que o organismo expresse uma nova proteína/informação que resulte no tratamento de determinadas patologias. Contudo, para que este DNA possa ser administrado é necessário que sejam cumpridas as exigências impostas pelas agências reguladoras, que recomendam um mínimo de 97% de pureza. Como tal, têm sido desenvolvidas diversas técnicas cromatográficas na expectativa de, juntamente com uma plataforma biotecnológica adequada, alcançar uma estratégia que permita a aplicação desta tecnologia na sociedade atual.

Para obter este DNA terapêutico tem-se explorado a produção de plasmídeos com recurso a organismos recombinantes. Contudo, estes plasmídeos contêm na sua constituição os elementos necessários para a produção nas bactérias e, existem diversos casos descritos na literatura de efeitos adversos por parte do organismo tratado resultantes da presença destas sequências. Neste contexto, surge o mcDNA que é constituído unicamente pela parte do plasmídeo que contém os genes de expressão eucariota, necessários para a expressão do gene terapêutico. Visto que o mcDNA pode ser uma abordagem mais eficiente do que o pDNA, é essencial que se estabeleçam estratégias de produção e purificação de modo a que a sua aplicação em terapia génica e vacinas de DNA se torne num conceito real e concretizável.

Neste trabalho procedeu-se à produção do plasmídeo parental no hospedeiro bacteriano *E. coli* seguida de obtenção de mcDNA com adição do indutor L-arabinose a 0,01% que permite uma recombinação eficiente. Após esta fase de produção, foi realizada uma etapa de pré-purificação para eliminar alguns constituintes da *E. coli* como gDNA e RNA, no entanto é fundamental o estabelecimento de uma estratégia cromatográfica adequada que permita isolar a isoforma sc do mcDNA das outras isoformas do mcDNA e das isoformas do PP que não foi completamente convertido no processo de indução.

Para que se possa estabelecer um processo cromatográfico eficaz na obtenção de mcDNA com a pureza pretendida é essencial um conhecimento vasto do tipo de interações que se podem estabelecer entre a amostra de mcDNA e o ligando imobilizado no suporte cromatográfico. Neste caso foram utilizados dois discos monolíticos, estando um modificado com histamina e outro com agmatina. Para o caso da histamina, foi estudada a eluição com dois sais diferentes: o NaCl e o sulfato de amónio. Para o caso da estratégia com NaCl observou-se que, quando aplicados valores de pH inferiores ao pKa da histamina se estabeleciam maioritariamente

interações iônicas visto que o ligando apresenta uma carga global positiva que, por conseguinte, interage fortemente com a carga negativa do DNA conferida pelos grupos fosfato. Ou seja, nestas condições o ligando encontra-se protonado havendo assim presença de catiões que podem estabelecer interações catião- π e interações eletrostáticas, para além das interações por pontes de hidrogénio e interações hidrogénio- π que este ligando também pode estabelecer com as bases dos ácidos nucleicos. A ausência do grupo carboxilo do ligando de histamina permite que se estabeleçam interações fortes com os ácidos nucleicos em condições de eluição iônicas, o que não é possível com o ligando de histidina. A estratégia de eluição com recurso a sulfato de amónio não permitiu obter a seletividade desejada e por sua vez torna-se uma estratégia menos interessante do ponto de vista industrial devido ao impacto ambiental das elevadas concentrações necessárias para promover interações entre o ligando de histamina e o mcDNA.

No caso do monolito de agmatina já só foi estudada a aplicação de NaCl como estratégia de eluição, sendo que de todas as abordagens esta foi a que permitiu melhores resultados e a purificação de uma pequena parte da isoforma sc do mcDNA. Neste estudo observou-se que se estabelecem maioritariamente interações eletrostáticas, para valores de pH inferiores ao pKa da agmatina e que estas são intensificadas com a diminuição pH, havendo nesses casos aumento do tempo de retenção do mcDNA. Observou-se de igual modo que o ligando de agmatina tem preferência pela isoforma sc eluindo assim mais tardiamente. Esta preferência pode estar relacionada com a maior exposição das bases associada a esta isoforma que permite o envolvimento de outro tipo de interações tais como interações catião- π e interações por pontes de hidrogénio entre as aminas do agmatina e preferencialmente as guaninas do sc mcDNA, para além das interações eletrostáticas com os grupos fosfato. Tendo em conta estas conclusões foram estudadas diversas condições tendo-se concluído que o gradiente que permite o isolamento da isoforma sc do mcDNA no último passo começa com a aplicação de um primeiro passo sem a presença de sal, seguido de 1,5 M de NaCl, 2,25 M e 2,7 M em 10 mM de tampão Tris a pH 6. Sendo que com a aplicação destas condições conseguiu isolar-se uma pequena parte da isoforma sc do mcDNA no último passo cromatográfico.

Neste tipo de estudos é necessário um equilíbrio entre o rendimento e a pureza. No presente trabalho foi obtida a biomolécula de interesse no último passo cromatográfico com um grau de pureza satisfatório mas para tal foi necessário sacrificar o rendimento tendo sido eluída parte do mcDNA nos passos anteriores. Assim, surge a necessidade de realizar estudos futuros que permitam a otimização deste resultado, tentando não comprometer o grau de pureza acompanhando com um aumento do rendimento. Estas novas estratégias poderão passar pela adição de moléculas de competição ao tampão, como a arginina ou por um pequeno ajuste das concentrações de sal aplicadas de modo a tentar comprometer uma menor quantidade da biomolécula de interesse em passos anteriores. Posto isto, deverão ser realizados testes de modo a observar se a amostra purificada obtida cumpre com os pré-requisitos impostos pelas

agências reguladoras, isto é, se apresenta uma pureza de 97% acompanhada de uma quantidade mínima aceitável de contaminantes específicos. É também de extrema importância que sejam realizados ensaios *in vitro* de modo a avaliar a eficiência de transfeção e expressão da biomolécula purificada.

Em suma, com o presente trabalho foi possível verificar que através da manipulação correta das condições cromatográficas pode promover-se o bioreconhecimento do mcDNA pelos derivados de aminoácidos aqui estudados, de modo a que se consiga isolar a isoforma sc do mcDNA para aplicação posterior com recurso à terapia génica e a vacinas de DNA.

Referências Bibliográficas

- [1] S.D. Patil, D.G. Rhodes and D.J. Burgess, "DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems : A Comprehensive Review," *AAPS J.*, vol. 7, no.1, pp 61-77, 2005.
- [2] F. Sousa, L. Passarinha and J.A. Queiroz, " Biomedical application of plasmid DNA in gene therapy : A new challenge for chromatography," *Biotechnol. Genet. Eng.*, vol 26, pp 83-116, 2009.
- [3] 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 353-379, 2015.
- [4] 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, pp 3-20, 2012.
- [5] D. Ibraheem, A. Elaissari and H. Fessi, "Gene therapy and DNA delivery systems," *Int. J. Pharm.*, vol. 459, pp. 70-83, 2014.
- [6] D. Kobelt, M. Schleef and M. Schmeer, "Performance of High Quality Minicircle DNA for In Vitro and In Vivo Gene Transfer," *Mol. Biotechnol.*, vol. 53, pp. 80-89 2013.
- [7] T. Wirth, N. Parker and S. Ylä-herttua, "History of gene therapy," *Gene.*, vol. 525, pp. 162-169, 2013.
- [8] M. Kendirci, P.E. Teloken, H.C. Champion, W.J.G. Hellstrom and T.J. Bivalacqua, "Gene Therapy for Erectile Dysfunction : Fact or Fiction?," *Eur. Urol.*, vol. 50, pp. 1208-1222, 2006.
- [9] D.J. Glover, H.J. Lipps and D.A. Jans, "TOWARDS SAFE , NON-VIRAL THERAPEUTIC GENE EXPRESSION IN HUMANS," *Nat. Rev.*, vol 6, pp. 299-311, 2005.
- [10] 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.
- [11] S. Gurunathan, D.M. Klinman and R.A. Seder, "DNA VACCINES : Immunology , Application and Optimization," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, pp. 927-974, 2000.
- [12] M.A. Liu, "DNA vaccines : a review," *J. Intern. Med.*, vol. 253, pp. 402-410, 2003.
- [13] X. Yin, W. Wang, X. Zhu, Y. Wang, S. Wu, Z. Wang, L. Wang, Z. Du, J. Gao and J. Yu, "Synergistic antitumor efficacy of combined DNA vaccines targeting tumor cells and angiogenesis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 465, pp. 239-244, 2015.
- [14] V.T. Colluru, L.E. Johnson, B.M. Olson and D.G. Mcneel, "Preclinical and clinical development of DNA vaccines for prostate cancer," *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*,

pp. 1-12, 2013.

- [15] L. Li, F. Saade and N. Petrovsky, "The future of human DNA vaccines," *J. Biotechnol.*, vol. 162, no. 2-3, pp. 171-182, 2013.
- [16] Y. Xu, P. Yuen and J.K. Lam, "Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives," *Pharmaceutics.*, vol. 6 pp. 378-415, 2014.
- [17] K.H. Khan, "DNA vaccines : roles against diseases," *GERMS.*, vol. 3, no 1, pp. 26-35, 2013.
- [18] S. Li and L. Huang, "Nonviral gene therapy : promises and challenges," *Gene Ther.*, vol. 7, pp.31-34, 2000.
- [19] D. Luo and W.M. Saltzman, "Synthetic DNA delivery systems," *Nat. Am.*, vol. 18, pp. 33-37, 2000.
- [20] J.F. Coelho, P.C. Ferreira, P. Alves, R. Cordeiro, A.C. Fonseca, J.R. Góis and M.H. Gil, "Drug delivery systems : Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments," *EPMA J.*, vol. 1, pp. 164-209, 2010.
- [21] D. Bouard, F. Cosset, *Viral vectors : from virology to transgene expression*, *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 153-165. doi:10.1038/bjp.2008.349.
- [22] T.B. Lentz, S.J. Gray and R.J. Samulski, "Viral Vectors for Gene Delivery to the Central Nervous System," *Neurobiol Dis.*, vol. 48, no 2, pp. 179-188, 2013.
- [23] A. Sharma, X. Li, D.S. Bangari and S.K. Mittal, "Adenovirus receptors and their implications in gene delivery," *Virus Res.*, vol. 143, no 2, pp. 184-194, 2010.
- [24] L. Ceccherini-nelli, L. Vannucci, M. Lai, F. Chiuppesi, L. Ceccherini-nelli and M. Pistello, "Viral vectors : A look back and ahead on gene transfer technology," *New Microbiol.*, vol. 36, pp.1-22, 2013.
- [25] B. Kantor, R.M. Bailey, K. Wimberly, S.N. Kalburgi and J. Steven Gray, "Methods for Gene Transfer to the Central Nervous System," *Adv. Genet.*, vol. 87, pp. 125-197, 2014.
- [26] M. Foldvari, D.W. Chen, D. Calderon, L. Narsineni and A. Rafiee, "Non-viral gene therapy : Gains and challenges of non-invasive administration methods," *J. Control. Release*, pp.1-26, 2015.
- [27] F. Sousa, S. Freitas, A.R. Azzoni, D.M.F. Prazeres and J. Queiroz, "Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine - agarose chromatography step," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 45, pp. 131-140, 2006.
- [28] J.F.A. Valente, A. Sousa, J.A. Queiroz and F. Sousa, "Selective purification of supercoiled p53-encoding pDNA with L -methionine - agarose matrix," *Anal. Biochem.*, vol. 459, pp. 61-69, 2014.
- [29] F. Sousa, D.M.F. Prazeres and J.A. Queiroz, "Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA," *Trends in Biotechnol.*, vol. 26, no

- 9, pp. 518-525, 2008.
- [30] Â. Sousa, P. Pereira, F. Sousa and J.A. Queiroz, "Binding mechanisms for histamine and agmatine ligands in plasmid deoxyribonucleic acid purifications," *J. Chromatogr. A.*, vol. 1366, pp. 110-119, 2014.
- [31] A. Sousa, F. Sousa and J.A. Queiroz, "Differential interactions of plasmid DNA , RNA and genomic DNA with amino acid- based affinity matrices," *J. Sep. Sci.*, vol. 33, pp. 2610-2618, 2010.
- [32] F. Silva, L. Passarinha, F. Sousa, J.A. Queiroz and F.C. Domingues, "Influence of Growth Conditions on Plasmid DNA Production," *J. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 1-7, 2008).
- [33] M.S. Al-dosari and X. Gao, "Nonviral Gene Delivery : Principle , Limitations , and Recent Progress," *AAPS J.*, vol. 11, no. 4, pp. 671-681, 2009.
- [34] A. Stryjewska, K. Kiepusa, T. Librowski and S. Lochynski, "Biotechnology and genetic engineering in the new drug development . Part II . Monoclonal antibodies , modern vaccines and gene therapy," *Pharmacol. Reports.*, vol. 6, pp. 1086-1101, 2013.
- [35] P.H. Oliveira and J. Mairhofer, "Marker-free plasmids for biotechnological applications - implications and perspectives," *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 9, pp. 539-547, 2013.
- [36] 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, pp. 691-708, 2012.
- [37] M. Gaspar, J. Maia, J.A. Queiroz, C. Pichon, J. Correia, and F. Sousa "Improved Minicircle DNA biosynthesis for Gene Therapy Applications," *Hum. Gene Ther.*, vol. 25 pp. 93-105, 2014.
- [38] R. Ismail, Z. Nazariah and M.M. Lila, "Scaling-up recombinant plasmid DNA for clinical trial : Current concern , solution and status," *Vaccine.*, vol. 30, pp. 5914-5920, 2012.
- [39] J. Urthaler, W. Buchinger and R. Necina, "Improved downstream process for the production of plasmid DNA," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 52, no. 3, pp. 703-711, 2005.
- [40] S.N. Cohen, A.C.Y. Chang, H.W. Boyer and R.B. Helling, "Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, vol. 70, no. 11, pp. 3240-3244, 1973.
- [41] 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, pp. 84-87, 2013.
- [42] J.A. Williams, A.E. Carnes and C.P. Hodgson, "Plasmid DNA vaccine vector design : Impact on efficacy , safety and upstream production," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, pp. 353-370, 2009.
- [43] 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, pp. 865-883, 2003.
- [44] 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, pp. 805-813, 2009.
- [45] F. Silva, J.A. Queiroz and F.C. Domingues, "Plasmid DNA fermentation strategies : influence on plasmid stability and cell physiology," *Appl Microbiol Biotechnol and Cell Phys.* vol. 93, pp. 2571-2580, 2012.
- [46] G.N.M. 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," *Tibtech Sept.*, vol. 18, pp. 380-388, 2000.
- [47] Â. Sousa, F. Sousa and J.A. Queiroz, "Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, pp. 3046-3058, 2012.
- [48] H.C. Birnboim and J. Doly, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 7, no. 6, 1513-1524, 1979.
- [49] J. Stadler, R. Lemmens and T. Nyhammar, "Plasmid DNA purification," *J. Gene Med.*, vol. 6, pp. 54-66, 2004.
- [50] F. Sousa, C.T. Tomaz, D.M.F. Prazeres and J.A. Queiroz, "Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine - agarose support," *Anal. Biochem.*, vol. 343, pp. 183-185, 2005.
- [51] F. Sousa, D.M. Prazeres and J.A. Queiroz, "Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 23, 160-165, 2009.
- [52] A. Sousa, A.M. Almeida, U. Cernigoj, 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.
- [53] C. Cruz, Â. Sousa, É. Mota, F. Sousa and J.A. Queiroz, "Quantitative analysis of histamine- and agmatine - DNA interactions using surface plasmon resonance," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 70, pp. 131-137, 2014.
- [54] A. Hirano, T. Arakawa and T. Kameda, "Effects of arginine on multimodal anion exchange chromatography," *Protein Expr. Purif.*, vol. 116, 105-112, 2015.
- [55] D. Bicho, C. Caramelo-nunes, A. Sousa, F. Sousa, J.A. Queiroz and C.T. Tomaz, "Purification of influenza deoxyribonucleic acid-based vaccine using agmatine monolith," *J. Chromatogr. B.*, vols. 1012-1013, pp. 153-161, 2016.
- [56] R.D. Arrua, M. Talebi, T.J. Causon and E.F. Hilder, "Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules," *Anal. Chim. Acta.*, vol. 738, pp.1-12, 2012.
- [57] A. Podgornik, S. Yamamoto, M. Peterka and N.L. Krajnc, "Fast separation of large

- biomolecules using short monolithic," *J. Chromatogr. B.*, vol. 927, pp. 80-89, 2013.
- [58] V. Rajamanickam, C. Herwig and O. Spadiut, "Monoliths in Bioprocess Technology," *Chromatography.*, vol. 2, pp. 195-212, 2015.
- [59] S.M. Cramer and M.A. Holstein, "Downstream bioprocessing : recent advances and future promise," *Chem. Eng.*, vol. 1, pp. 27-37, 2011.
- [60] B.Y.N.R. Cozzarelli, R.B. Kelly and A. Kornberg, "A minute circular DNA from *Escherichia Coli* 15," *Biochemistry.*, vol. 60, pp. 992-999, 1968.
- [61] Z. Chen, C. He and M.A. Kay, "Improved Production and Purification of Minicircle DNA Vector Free of Plasmid Bacterial Sequences and Capable of Persistent Transgene Expression In Vivo," *Hum. Gene Ther.*, vol. 16, pp. 126-131, 2005).
- [62] D. Scherman, A. Darquet, B. Cameron, P. Wils, D. Scherman and J. Crouzet, "A new DNA vehicle for nonviral gene delivery : supercoiled minicircle." *Gene Ther.*, vol. 4, pp. 1341-1349, 1997.
- [63] N. Nafissi and R. Slavcev, "Bacteriophage recombination systems and biotechnical applications," *Appl Microbiol Biotechnol.*" vol. 98, pp. 2841-2851, 2014.
- [64] C.P.A. Alves, M. Simcikova, L. Brito, G.A. Monteiro and D.M.F. Prazeres, "Development of a nicking endonuclease-assisted method for the purification of minicircles," *J. Chromatogr. A.*, vol. 1443, pp. 136-144, 2016.
- [65] 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, pp. 169-174, 1999.
- [66] P. Mayrhofer, M. Blaesen, M. Schleef and W. Jechlinger, "Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography," *J. Gene Med.*, vol. 10, pp. 1253-1269, 2008.