

Patrícia Duarte

**DESENVOLVIMENTO DA LINHAGEM CELULAR
LEY79SF PARA PRODUÇÃO DE ADENOVÍRUS
LIVRE DE PARTÍCULAS COMPETENTES DE
REPLICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2009

Patrícia Duarte

**DESENVOLVIMENTO DA LINHAGEM CELULAR
LEY79SF PARA PRODUÇÃO DE ADENOVÍRUS
LIVRE DE PARTÍCULAS COMPETENTES DE
REPLICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof. Dra. Eugenia Costanzi-Strauss

São Paulo

2009

RESUMO

Duarte P. Desenvolvimento da linhagem LEY79SF para produção de Ad livre de RCA [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Introdução: Produção de adenovírus (Ad) é uma etapa de inovação biomédica, incluindo protocolos de terapia gênica. A presença de Ad com competência para replicar (RCA, *replication-competent adenovirus*) nas preparações é um dos maiores problemas para a produção de Ad em larga escala. RCAs são gerados pela recombinação entre sequência do vetor e sequência homóloga do gene E1 presente nas células *helper*. **Objetivo:** desenvolver uma nova linhagem auxiliar (*helper*) para produção de Ad livre de RCA. **Métodos e Resultados:** A linhagem LEY79 é derivada da linhagem de retinoblastoma humano Y79, tratando-se da primeira linhagem empacotadora de adenovírus com inativação mutacional da proteína supressora de tumor pRb, adaptadas ao crescimento em suspensão. A sequência ΔE1AE1B do Ad5 foi gerada a partir de DNA genômico das células HEK293A de modo a eliminar as sequências de homologia, utilizando os *primers* de PCR contendo sítios de restrição EcoR I e BamH I. O produto de PCR ΔE1AE1B foi inserido nestes sítios do vetor retroviral pCLXSN. Células Y79 foram infectadas com o retrovírus pCLΔE1A/E1BSN e selecionadas com G418. A eficiência de produção de AdeGFP na linhagem LEY79 foi testada e comparada com a linhagem HEK293A. Em paralelo, as células Y79 foram adaptadas para crescimento em meio livre de soro. **Conclusões:** Esperamos com a linhagem LEY79SF inovar no campo de processos para a produção de Ad recombinante.

Palavras-chave: Linhagem produtora. Adenovírus. RCA. Retrovírus. Vetores retrovirais.

ABSTRACT

P. Duarte. Development LEY79SF line for production of RCA-free Ad [Dissertation]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2009.

Introduction: Production of adenovirus (Ad) is a step in biomedical innovation, including protocols for gene therapy. The presence of Ad with the ability to replicate (RCA, replication-competent adenovirus) in preparations is a major problem in the large-scale production of Ad. RCAs are generated by recombination between the vector sequence and sequence of the homologous gene in E1 helper cells.

Objective: To develop a new helper cell line for the production of RCA-free Ad.

Methods and Results: The LEY79 cells are derived from the Y79 of human retinoblastoma line, the first line Packer adenovirus with mutational inactivation of the tumor suppressor protein pRb, which are adapted to grow in suspension. The sequence Δ E1AE1B of Ad5 was generated from genomic DNA of cells HEK293A by removing the sequence homology, using the PCR primers containing the EcoRI and BamH I restriction sites. The product from PCR Δ E1AE1B was inserted into these sites of retroviral vector pCLXSN. Y79 cells were infected with the retrovirus pCL Δ E1A/E1BSN and selected with G418. The efficiency of production of AdeGFP in the LEY79 was tested and compared with the HEK293A. In parallel, the Y79 cells were adapted to grow in serum-free medium. **Conclusions:** We hope that use of the LEY79SF cell line will promote innovation in the processing and production of recombinant Ad.

Keywords: Lineage producer. Adenovirus. RCA. Retrovirus. Retroviral vectors.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os adenovírus humanos

Adenovírus são partículas icosaédricas não-envelopadas que possuem um diâmetro de 70-100 nm. Cada partícula viral é constituída por DNA rodeado por uma camada de proteína, composta de 252 subunidades, denominada capsômeros (240 subunidades, hexons; 12 subunidades, pentons). Mais de 49 sorotipos de adenovírus humanos foram identificados e classificados em seis distintos subgrupos (A - F), muitos dos quais estão associados com doenças respiratórias, gastrointestinais ou oculares. Dois deles, adenovírus tipo 2 e 5, que pertencem ao subgrupo C, estão entre os mais extensivamente estudados, tanto geneticamente quanto bioquimicamente, o que contribui na compreensão dos processos biológicos, como a regulação e expressão gênica celular e viral, replicação do DNA e controle do ciclo celular. Devido ao maior conhecimento sobre as características genéticas e biológicas dos adenovírus tipo 2 e 5, eles são comumente utilizados no desenvolvimento de vetores adenovirais recombinantes (Mizuguchi, Kay e Hayakawa, 2001).

Os adenovírus humanos contêm um DNA genômico linear, dupla fita, com aproximadamente 36 Kb, que codifica mais de 70 produtos gênicos. O genoma viral contém 5 unidades transcricionais iniciais (E1A, E1B, E2, E3, E4), duas unidades transcricionais intermediárias (pIX e IVa2) e 5 unidades tardias (L1-L5), os quais codificam principalmente proteínas estruturais para o capsídeo e região central do vírus. Os capsídeos são formados por três proteínas principais: *Hexon* (II), *Penton base* (III) e *knobbed fibre* (IV), e por um número de proteínas denominadas VI, VIII, IX, IIIa e IVa2 (Figura 1) (Russell, 2000). Os ITRs (*Inverted Terminal Repeats*) nas extremidades dos cromossomos virais funcionam como origens de replicação (Mizuguchi, Kay e Hayakawa, 2001).

O processo de interação do adenovírus com a célula hospedeira inicia-se com sua adesão em receptores celulares CAR (*Coxsackie-Adenovirus Receptor*), que determinam sua alta suscetibilidade para interagir com estruturas salientes do

capsídeo do vetor adenoviral (*knob fibre*) essenciais à transdução viral (Mallam et al., 2004; White, Taylor e Pittler, 2001).

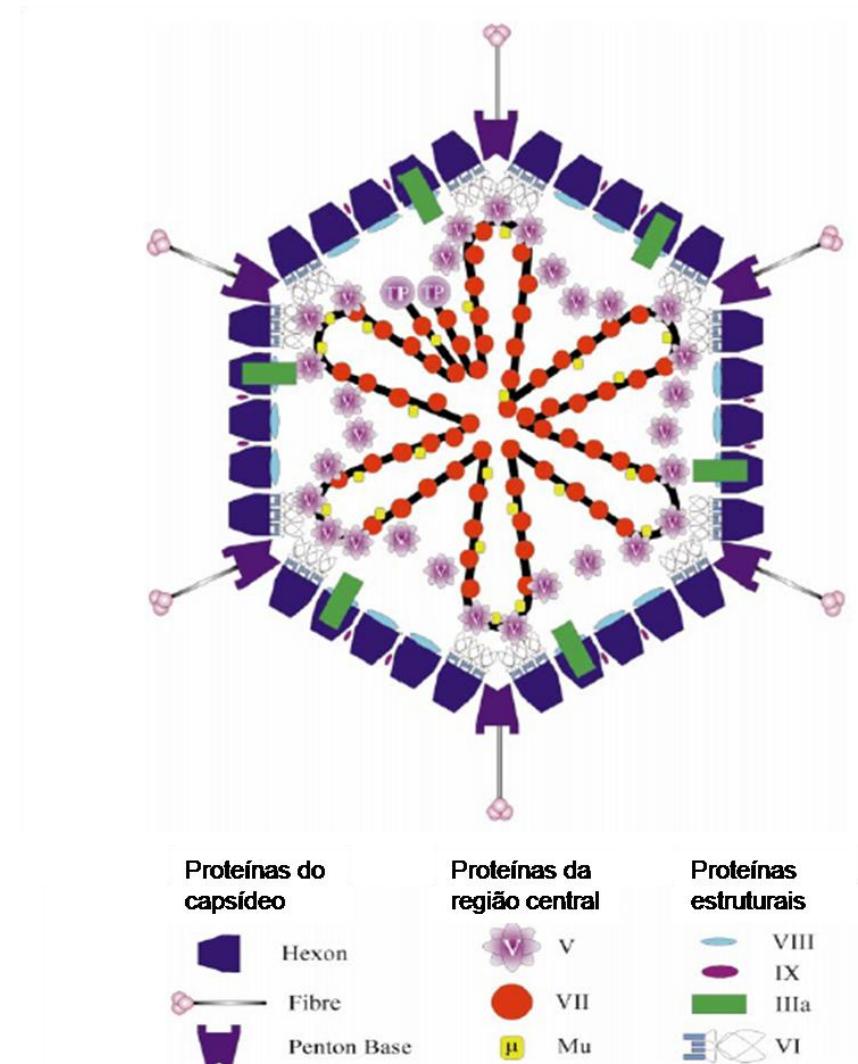


Figura 1: Esquema estrutural do adenovírus.[Modificado de Russell (2000)].

O processo de transcrição do adenovírus pode ser dividido em eventos iniciais, os quais ocorrem antes da replicação viral e eventos tardios, após a replicação. Com exceção da síntese de proteínas virais, a replicação ocorre inteiramente no núcleo da célula. Diversos genes necessitam ser expressos para que o DNA seja replicado. O gene E1A é a primeira unidade transcrecional a ser ativada logo após a infecção, sendo essencial para desencadear a ação de outros promotores e a replicação do genoma viral, que juntamente com o gene E1B são cruciais para este processo (Ginsberg, 1996).

Para que a transformação oncogênica ocorra, é necessária a interação de diversas proteínas celulares com as regiões conservadas do gene E1A, e ainda, a inibição da apoptose mediada por E1B. Os fatores de transcrição E2F regulam coordenadamente os genes que atuam de forma combinada para promover o início da fase S do ciclo celular, onde o DNA é sintetizado. Ao se vincularem os E2Fs na cromatina, as diversas proteínas membros da família Rb (Rb, p107, e p130) recrutam histonas deacetylas e fatores de remodelamento para promotores responsivos a E2F, reprimindo assim, a expressão gênica E2F-dependente (Lowe e Sherr, 2003). Na forma hipofosforilada, pRb se associa a vários fatores transpcionais, inibindo a divisão celular. Dentre esses fatores estão as proteínas E2Fs, responsáveis por ativar a expressão de genes relacionados à progressão do ciclo celular, como as ciclinas A e E (Kaelin, 1999). A fosforilação de proteínas Rb através de ciclinas-D e E – dependentes de kinases (Cdks) – libera os E2Fs, permitindo a execução do programa transicional de E2F. Por sua vez, proteínas InK4 (*Inhibitor of Cdk4*), como por exemplo p16^{InK4a}, podem inibir as Kinases dependentes de ciclinas-D, mantendo assim a repressão Rb-E2F e restringindo a proliferação celular (Lowe e Sherr, 2003).

A sequência do gene E1A adenoviral apresenta regiões conservadas (CRs), capazes de se associarem a diversas proteínas celulares, como p21, p27 e pRb (Berk, 2005). A menor destas regiões de E1A, sozinha, apresenta pouca atividade transformante, sendo aumentada através da ausência de E1B ou de outros inibidores de apoptose. Outras regiões conservadas de E1A (CR1 e CR2), requeridas para transformação, também induzem apoptose (White, Taylor e Pittler, 2001).

E1A, dentre outros fatores, causa a estabilização de p53, provavelmente pela indução de uma resposta a danos no DNA (Lowe e Ruley, 1993). Esta estabilização de p53 leva à apoptose, a menos que seja bloqueada por E1B-19K ou E1B-55k, as duas principais proteínas codificadas em E1B (White e Cipriani, 1990). Esta inibição de p53 e de outras vias proapoptóticas é um evento comum em tumores humanos (Lowe e Sherr, 2003). Ou seja, em infecções adenovirais e células transformadas, a inibição do ciclo celular e indução à apoptose mediada por p53 são bloqueadas pela ação da proteína E1B-55k. Entretanto, a infecção adenoviral também estimula apoptose por um mecanismo independente de p53, o qual é

bloqueado por outro produto de E1B, E1B-19k. Na ausência de E1B-19K, a indução de apoptose em células infectadas por adenovírus resulta na degradação do DNA celular e viral, assim como na morte prematura da célula infectada durante o ciclo lítico, limitando a replicação viral (White, Taylor e Pittler, 2001).

E1A associa-se à pRb, liberando os fatores de transcrição E2F e assim ativando os genes necessários para a replicação celular. A ligação de E1B-19K em genes proapoptóticos (BAK e BAX) faz com que estes genes sejam tornados inativos. E1B-55K associa-se com p53, inibindo sua função de ativação transcrecional (Berk, 2005). Consequentemente, o produto da unidade transcrecional E1 é importante no direcionamento da expressão gênica viral e celular, para possibilitar o ciclo de vida reprodutivo do vírus.

1.2 Os vetores adenovirais

Os adenovírus humanos têm sido amplamente utilizados como veículos de transferência gênica em uma vasta variedade de estudos clínicos e pré-clínicos (Chu *et al.*, 2004). Diversas características dos adenovírus os tornam adequados para serem utilizados como vetores na entrega de genes, pois transduzem uma ampla variedade de tipos celulares, independentemente do estado de proliferação destas células (quiescentes ou em divisão). Também apresentam habilidade de serem facilmente produzidos e purificados em altos títulos para aplicações clínicas, terem grande capacidade de empacotamento de genes exógenos e boa expressão do transgene (Kamen e Henry, 2004; McConnell e Imperiale, 2004; Xu *et al.*, 2005; Segura *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2008).

Os Adenovírus humanos do tipo 5, subgrupo C (Ad5), com uma deleção da sequência E1 (*Early region 1*) de seu genoma, a qual é necessária para sua replicação, foram adaptados com a finalidade de entregar genes. Essa deleção gera um ponto de inserção de genes, nos sistemas adenovirais recombinantes. A primeira geração de vetores adenovirais possui uma capacidade de clonagem de aproximadamente 6 Kb, desde que a região E1 esteja deletada (Yang *et al.*, 1995; Danthinne e Imperiale 2000; Meneses-Acosta *et al.*, 2008).

A maioria dos vetores adenovirais utilizados atualmente têm sido derivados de vírus do subgrupo C, tipo 5 (AdV5), pela deleção de porções ou de toda a sequência codificadora viral e pela substituição destes por genes *reporter* ou de interesse terapêutico. O CAR foi identificado como um receptor celular para fibras adenovirais do subgrupo C, tipos 2 e 5 (AdV2 e AdV5). Estudos subsequentes têm demonstrado que, com exceção do grupo B, todos os sorotipos representativos dos grupos A, C, D, E e F utilizam CAR como receptor celular (Roelvink *et al.*, 1998). Vetores adenovirais baseados nos vírus do tipo 5 também requerem a presença de α-integrinas para que ocorra a internalização (Nemerow e Stewart, 1999).

A produção dos vetores adenovirais apresenta limitações no que tange à alta produtividade requerida para aplicações clínicas, pureza e adequação a requisitos clínicos. O FDA - *U.S. Food and Drug Administration* (2009) estabeleceu que a presença de RCA nas preparações de adenovírus deficientes para replicar deve ser menor do que 1 RCA em 3×10^{10} partículas virais. Para satisfazer tais exigências, linhagens produtoras vêm sendo desenvolvidas desde a década de 70, com a intenção de propiciar condições para replicação de vetores adenovirais em linhagens celulares E1-complementares, como a HEK293 (Graham *et al.*, 1997), 911 (Fallaux *et al.*, 1996) e Per. C6 (Fallaux *et al.*, 1998), que foram transformadas com as sequências dos genes E1A e E1B do Ad5 (Figura 2).

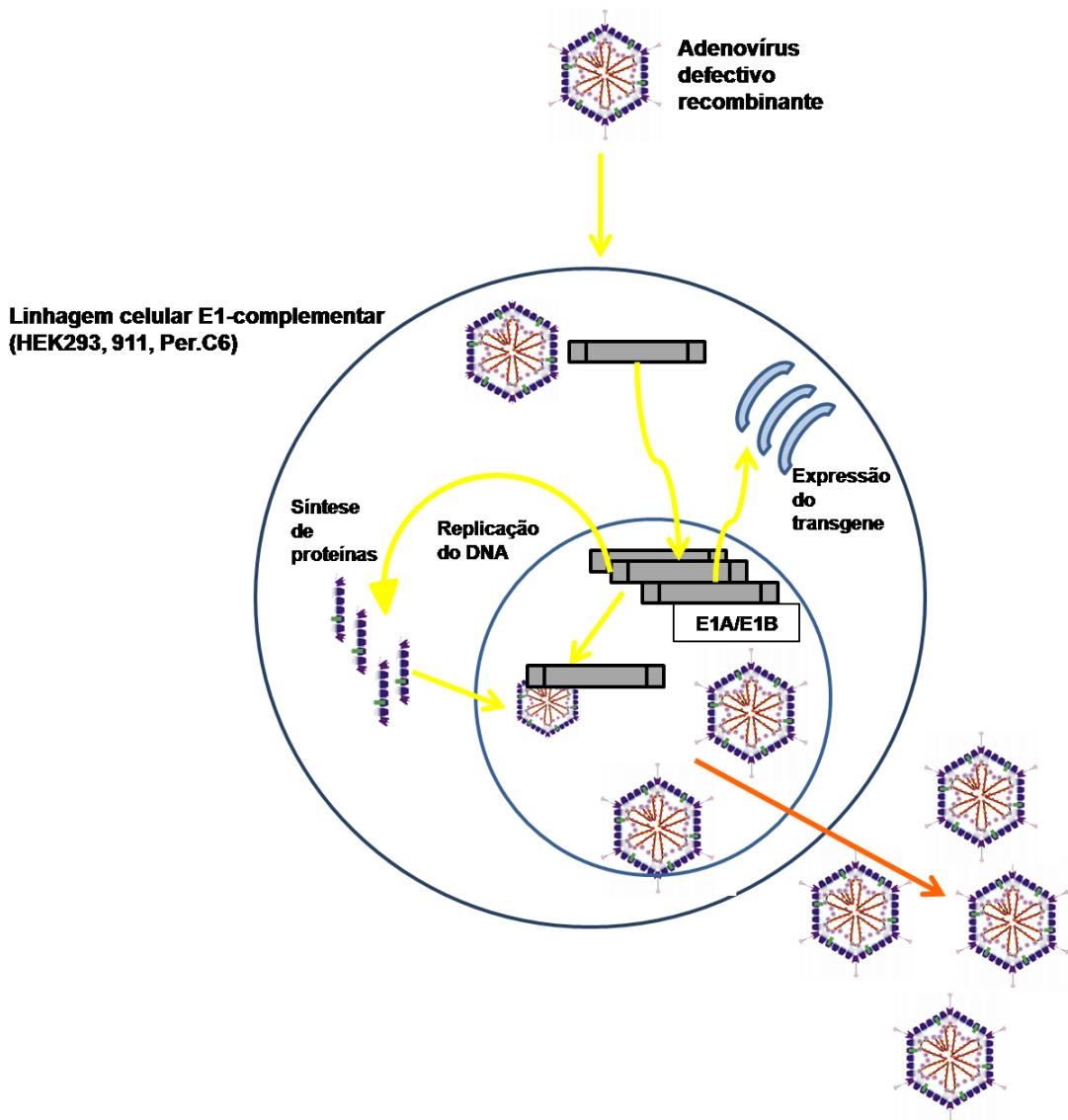


Figura 2: Diagrama descritivo da replicação de adenovírus defectivos em linhagens celulares E1-complementares. [Modificado de Kamen e Henry (2004)].

Estudos demonstraram que tanto os adenovírus quanto apenas fragmentos do DNA adenoviral são capazes de transformar células de mamíferos *in vitro*. Esta capacidade é devida ao produto gênico gerado pelas sequências de DNA localizadas no segmento inicial do genoma viral e que compreende cerca de 11% deste (Zantema *et al.*, 1985), sendo denominada região E1, a qual consiste de duas unidades transcricionais, E1A e E1B. A região E1A causa transformação parcial e imortalização de células primárias, enquanto que a presença da região E1B completa este processo (Zantema *et al.*, 1985; Schwartz *et al.*, 2008).

1.2.2 Adenovírus competentes de replicação

No que diz respeito à segurança dos vetores adenovirais produzidos, é especialmente preocupante o aparecimento de vírus que readquirem sua capacidade replicativa, os quais são chamados de adenovírus competentes de replicação (RCA), (Figura 3). A recombinação homóloga entre sequências do vetor adenoviral e dos genes E1 presentes nas células produtoras tem demonstrado ser a fonte predominante de RCA nas células HEK293 e 911. Como resultado, o vetor perde seu transgene e readquire a região E1 (Hehir *et al.*, 1996). A Figura 3A ilustra representativamente a forma como estas sequências homólogas podem dar origem às partículas adenovirais com capacidade replicativa. Na Figura 3B, um esquema simplificado das sequências do Ad5 e seus respectivos nucleotídeos, que estão presentes nas diversas linhagens empacotadoras e que apresentam homologia com os vetores adenovirais recombinantes.

As determinações de RCAs são geralmente realizadas nos lotes pré-clínicos e clínicos através da observação de efeito citopático em linhagens de células permissivas como Hela e A549, sendo adicionalmente utilizado o método de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para aumentar a sensibilidade do método (Hehir *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1999).

Linhagens celulares *helper*, como a Per.C6 (Fallaux *et al.*, 1998) e HEL299 (Xu *et al.*, 2006) foram desenvolvidas com o objetivo de prevenir a formação de RCAs, através da eliminação das sequências homólogas existentes entre o vetor adenoviral e as sequências adenovirais presentes na célula, já que para as diversas aplicações terapêuticas, a geração de RCA permanece como um critério de segurança para a produção de lotes que serão utilizados em testes clínicos (Roitsch *et al.*, 2001).

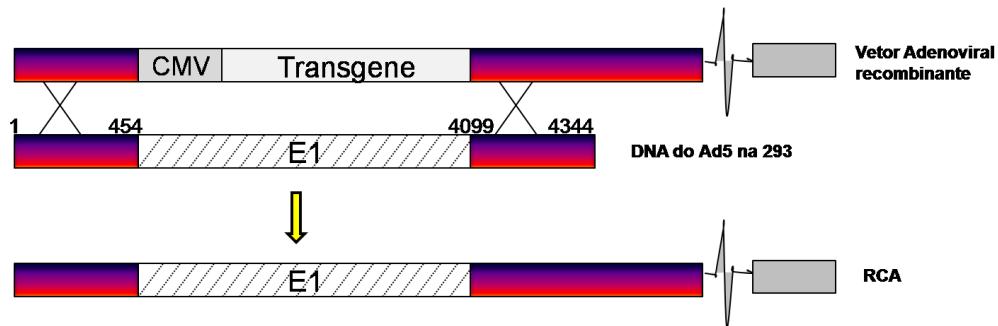
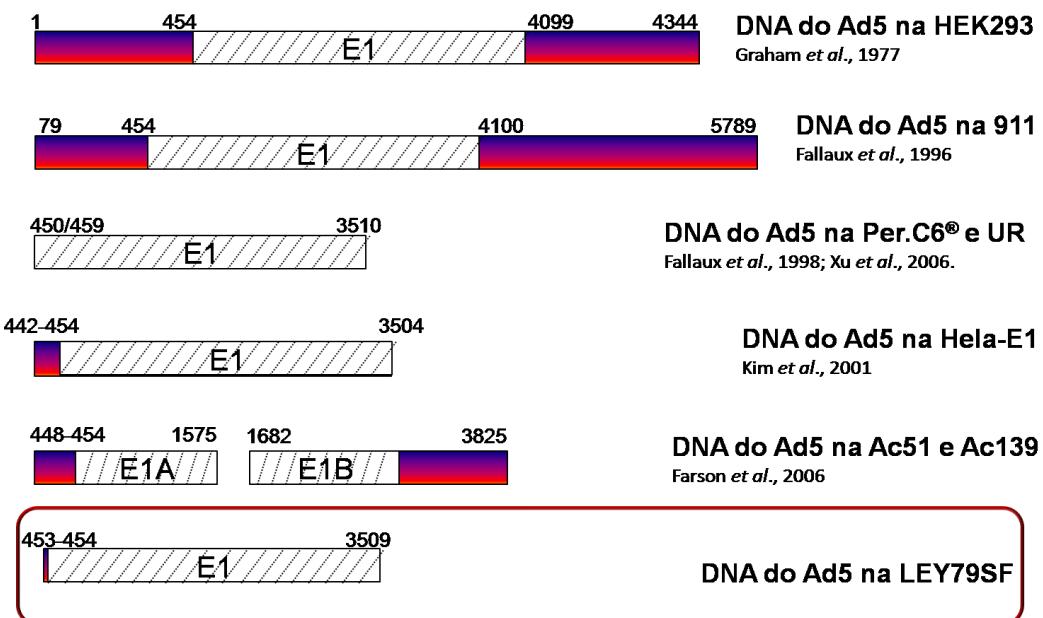
A**B**

Figura 3: Esquema representativo do processo de formação de RCA e sequências de homologia presentes nas diversas linhagens produtoras de adenovírus. **A)** Os números sobre as barras coloridas indicam os nucleotídeos iniciais e finais presentes no genoma da linhagem empacotadora HEK293 com os quais existe homologia com os vetores adenovirais recombinantes, possibilitando que o vetor perca o transgene e readquira a região E1, o que determina na geração de RCAs. **B)** Representação esquemática das sequências de homologia nas diversas linhagens empacotadoras.

Em seguida, descreve-se uma revisão sobre as principais linhagens produtoras de adenovírus (Quadro 1) e os recentes avanços nos métodos de produção de vetores adenovirais recombinantes.

1.3 As principais linhagens produtoras de adenovírus recombinantes

Terapia gênica é uma forma de medicina molecular que possui potencial de influenciar significativamente a saúde humana neste século e promete fornecer novos tratamentos para um grande número de doenças herdadas ou adquiridas (Verma e Weitzman, 2005). Dentre os grandes desafios desta medicina genética, está o desenvolvimento de novas biotecnologias para obtenção de ferramentas adequadas e seguras, capazes de fornecer produtos biológicos para serem utilizados tanto em estudos como em protocolos clínicos experimentais.

Há mais de 30 anos, linhagens produtoras de vetores adenovirais vêm sendo desenvolvidas, sendo este atualmente o mais utilizado em protocolos de terapia gênica (Edelstein, 2009). A expressão de E1A nas linhagens produtoras não é apenas um requerimento para replicação e produção de adenovírus. Em colaboração com E1B, E1A é fundamental na imortalização celular. Células imortalizadas com as sequências E1A e E1B são induzidas a entrar na fase S do ciclo celular, essencial para a replicação do DNA viral. Desta forma, a estratégia de cotransfetar E1A e E1B viabiliza a criação de linhagens imortais com alta expressão de E1A e estas células podem ser utilizadas para a produção de adenovírus.

A linhagem celular comumente utilizada para a produção de vetores adenovirais E1-deletados é a *helper HEK293* (*Human Embryonic Kidney*), que oferece os genes E1A e E1B, necessários à replicação viral. Esta linhagem tem origem de células embrionárias de rim humano, e foi transformada com as sequências E1A – E1B (nucleotídeos 1-4344) do adenovírus selvagem tipo 5 subgrupo C (Ad5), (Graham *et al.*, 1977; Louis, Evelegh e Graham, 1997).

O desenvolvimento da linhagem HEK293 foi realizado através da técnica de transfecção com fosfato de cálcio, desenvolvida para introduzir o DNA viral nas células. O princípio desta técnica envolve a mistura de DNA com uma solução tampão, composta por fosfato e cloreto de cálcio, que resulta em um complexo que adere à membrana celular e é introduzido no citoplasma por endocitose. O fato de se tratar de um processo de transfecção estável permitiu o isolamento de células

humanas transformadas com adenovírus, até então, nunca relatada. Este fato foi de especial importância, visto que este processo pôde ser induzido utilizando-se fragmentos de DNA viral, e não com a partícula viral em si (Graham *et al.*, 1977).

Os métodos de produção dos vetores adenovirais diferem de acordo com o tipo de cultura celular: linhagens celulares aderidas e linhagens celulares em suspensão (Nadeau e Kamen, 2003). Na maioria das vezes, a densidade de plaqueamento de HEK293 em sistema de cultura aderente é cerca de 1 a $1,5 \times 10^4$ células/cm². As células são cultivadas até 10^5 células/cm² e então são infectadas. Usualmente, a produtividade celular específica, ou seja, quantidade de partículas virais/célula é ligeiramente mais alta para células aderentes (7000 – 12000 PFU/célula) quando comparado com células cultivadas em suspensão (5000 PFU/célula). Entretanto, a produtividade volumétrica permanece limitada pela área de superfície (Nadeau e Kamen, 2003).

Os vetores adenovirais apresentam boa replicação em cultura, podendo ser obtidos em altos títulos, necessários para aplicações *in vivo* (Wu e Ataai, 2000). A produção destes vetores vem sendo realizada de diversos meios: em sistemas aderidos, como frascos de cultura celular, microcarreadores (Iyer, Ostrove e Vacante, 1999) e em tanques de biorreatores com células totalmente em suspensão sob agitação (Cotê *et al.*, 1998, Iyer, Ostrove e Vacante, 1999), sendo este último o mais adequado para a implementação da escala de produção a nível industrial (Maranga, Aunins e Zhou, 2005). Liu *et al.* (2009) demonstraram recentemente a viabilidade do uso de agregados celulares de HEK293 cultivados em suspensão, como meio de facilitar a perfusão e melhorar a produtividade por eliminar o efeito de “densidade celular”, fator que inibe a proliferação celular. Além disso, o método de perfusão em biorreatores, que consiste na reposição contínua de nutrientes e remoção dos metabólitos tóxicos, tem demonstrado ser o mais eficiente meio de produção de vetores adenovirais recombinantes (Henry *et al.*, 2004; Cortin *et al.*, 2004).

Fallaux *et al.* (1996) desenvolveram uma linhagem alternativa à HEK 293 para a produção de vetores adenovirais: a linhagem 911. Esta linhagem foi gerada através da transformação de retinoblastos embrionários humanos (HER – *Human Embryonic Retina*), com o plasmídeo pAd5XholC, contendo nucleotídeos 79-5789 do genoma do Ad5, que carreia a unidade transcrevional dos genes E1A e E1B, através

da técnica de transfecção com fosfato de cálcio. Estudos demonstraram que a qualidade da linhagem 911 se equipara à da linhagem HEK293 em relação à eficiência de transfecção e frequência de recombinação. Comparada à HEK293, a linhagem 911 exibiu uma maior produção de vírus em ensaios de pequena escala. Estas células apresentaram um fenótipo estável, assim como a produção de vírus por até 50 passagens (Fallaux *et al.*, 1996).

Devido à presença de sequências homólogas entre o vetor adenoviral e a sequências de Ad5 na linhagem 911, assim como na HEK293, podem ocorrer eventos de recombinação homóloga que resultam na geração de RCA, embora não tenha sido detectada a presença de RCA em ensaios realizados (Fallaux *et al.*, 1996). Portanto, as células 911 não podem se evadir do risco da geração de RCA por recombinação homóloga entre as sequências do Ad5 contidas no vetor e do fragmento do Ad5 integrado no genoma celular (Southgate *et al.*, 2008).

A linhagem NCLA549, produtora de adenovírus, é derivada de células A549, de carcinoma pulmonar humano, tendo sido transformada com a sequência de nucleotídeos 505-4034 (Imler *et al.*, 1996), sendo uma alternativa que pode oferecer vantagens sobre as células HEK293. O risco da geração de RCA é substancialmente reduzido em células NCLA549 devido à ausência de ITR na extremidade esquerda da sequência integrada do Ad5, que faz com que sejam necessários dois eventos de recombinação para que surja um RCA, enquanto na HEK293, um único evento é suficiente para produzir adenovírus competente de replicação. A transcrição do gene E1A demonstrou-se elevada na linhagem NCLA549, e a expressão da proteína E1A atingiu níveis similares ao da HEK293 (Imler *et al.*, 1996 *apud* Southgate *et al.*, 2008).

Em análise comparativa, a produtividade dos vetores utilizando-se a linhagem NCLA549 demonstrou-se menos eficiente do que nas células HEK293 (Imler *et al.*, 1996 *apud* Southgate *et al.*, 2008).

Fallaux *et al.* (1998) descreveram uma nova linhagem celular *helper*, que oferece os genes E1A e E1B com deleções nas extremidades 5` e 3`, de forma a eliminar as sequências homólogas entre o vetor e a célula *helper* e desta forma prevenir a formação de RCAs. O desenvolvimento desta linhagem, denominada Per.C6, objetivou a produção em larga escala de vetores adenovirais livres de

RCAs, tendo sido transformada com as sequências E1A – E1B (nucleotídeos de 450-3510) do adenovírus selvagem tipo 5, subgrupo C (Fallaux *et al.*, 1998). A linhagem celular Per foi gerada a partir de retinoblastos embrionário humano (HER cells), isoladas do mesmo embrião que também deu origem à linhagem 911 (Fallaux *et al.*, 1996).

Experimentos de produção de adenovírus E1-deletados foram realizados na linhagem Per.C6 em comparação com as clássicas linhagens HEK293 e 911. Resultados demonstraram que o título viral médio produzido na linhagem 911 ($1,9 \times 10^9$ PFU) foi ligeiramente maior do que nas células HEK293 ($1,2 \times 10^9$ PFU) (Fallaux *et al.*, 1996; Fallaux *et al.*, 1998). Dentre os vários clones testados, o clone Per.C6 apresentou melhor resultado, atingindo um título viral médio três vezes maior do que o obtido na HEK293 ($3,0 \times 10^9$ PFU) (Fallaux *et al.*, 1998).

A produção de vetores adenovirais foi verificada na linhagem Per.C6, paralelamente à linhagem HEK293, demonstrando a capacidade da Per.C6 em propagar estes vetores sem a geração concomitante de RCAs (Fallaux *et al.*, 1998).

A obtenção de vetores adenovirais E1-deletados em altos títulos, replicados na linhagem Per.C6, cujo produto se apresenta livre de partículas com capacidade replicativa, além do fato de estas células estarem aptas ao cultivo celular em suspensão e alta densidade, em sistema de cultivo livre de soro e outros componentes de origem animal (Fallaux *et al.*, 1998; Havenga *et al.*, 2008), torna a linhagem Per.C6 uma ferramenta tecnológica eficaz para obtenção de produtos bioativos, como vacinas e proteínas em larga escala.

Estudos demonstram por meio da utilização de sistemas e tecnologias baseadas nos vetores adenovirais e linhagem Per.C6, a obtenção de proteínas com bioatividade preservada e de alta qualidade, indicando ser esta uma alternativa promissora para sistemas de produção de proteínas em células humanas, eliminando a necessidade da utilização de linhagens não-humanas comumente envolvidas neste processo (Havenga *et al.*, 2008).

Fatores como a concentração celular ou efeito da densidade celular podem influenciar a concentração dos títulos virais obtidos nas produções em culturas de HEK293 (Nadeau e Kamen, 2003). A alta densidade celular parece limitar a infecção na concentração de $0,5\text{--}1\times 10^6$ células/mL a fim de obter

adenovírus eficientemente (Kamen e Henry, 2004). Maranga *et al.* (2005), demonstraram que infecções na linhagem celular Per.C6, em concentrações maiores que 1×10^7 células/mL, apresentaram alta produtividade volumétrica. Os adenovírus atingem maiores índices de replicação em células que estejam em processo de divisão, e uma infecção que obtém melhores resultados requer não apenas que as células estejam viáveis, mas também em fase de crescimento exponencial. A caracterização da produção na Per.C6 em suspensão em biorreatores permitiu a implementação desta tecnologia à escala industrial, com melhor custo-benefício na obtenção de vetores com qualidade tanto para terapia genética ou vacinas (Maranga, Aunins e Zhou, 2005).

Kim *et al.* (2001) construíram uma nova linhagem empacotadora, a HeLa-E1, a qual possui a região mínima do gene E1 do Ad5. Foi demonstrado neste estudo que estas células não geraram RCA durante a produção de adenovírus, em comparação com as células HEK293.

A linhagem Hela-E1 foi produzida através da introdução de E1 na linhagem celular de câncer cervical, Hela. O gene E1 de Ad5 foi obtido a partir do DNA genômico da célula HEK293 por meio de PCR (nucleotídeos de 542-3504 pb). O produto do PCR foi então克lonado no vetor pCR3.1-Uni (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para construir uma linhagem celular estável de HeLa-E1, células HeLa foram lipofectadas, e posteriormente selecionadas com G418. Finalmente, um clone foi isolado e propagado. A expressão do gene E1A nas células HeLa-E1 foi confirmada por meio da análise de *Western Blot* (Kim *et al.*, 2001).

Os DNAs dos adenovírus que foram produzidos, tanto na linhagem Hela-E1 quanto na HEK293, foram analisados quanto à presença de RCA através de PCR para avaliar a presença do gene E1A. Nos vírus produzidos pela HeLa-E1 não houve detecção de E1A por PCR, enquanto que nos vírus obtidos da linhagem HEK293 observou-se a presença de RCA. Estes resultados indicam que a produção destes vetores utilizando a Hela-E1 exclui a geração de RCA. Porém, a linhagem HeLa-E1 apresentou uma produtividade menor de adenovírus quando comparada com as células HEK293 (Kim *et al.*, 2001).

Para eliminar a geração de RCA durante a produção de vetores adenovirais por meio da recombinação homóloga com o DNA genômico da célula

empacotadora, Xu *et al.* (2006) construíram uma nova linhagem, gerada a partir de células HEL 299, estas originárias de pulmão embrionário humano (HEL -*Human Embryonic Lung*), com complementação de E1, contendo nucleotídeos de 459-3510 do Ad5, denominada UR. Esta linhagem produz vírus livres de RCA mesmo após múltiplas passagens. Os vírus produzidos na linhagem UR foram analisados após várias passagens e pode-se confirmar que estavam livres de RCA, enquanto que o produto gerado na linhagem HEK293 apresentou RCA já durante as passagens iniciais (Xu *et al.*, 2006).

A construção da linhagem celular UR foi por meio de lipofecção do plasmídeo pZAdE1 contendo a sequência de Ad5 E1A/E1B nas células HEL299. Após aumentar gradualmente a concentração de G418 no meio de cultura, três clones transformados e estáveis, resistentes a G418, foram selecionados. Um dos clones foi expandido e chamado de UR. A presença da sequência E1A/E1B foi confirmada através de ensaio de PCR (Xu *et al.*, 2006).

A linhagem UR contém a sequência do gene E1, mas que exclui as regiões que são conhecidas por serem homólogas com o DNA dos vetores originados a partir do Ad5. Enquanto que as células HEK293 contêm 4344 pares de bases (pb) do DNA genômico do Ad5 (Louis, Evelegh e Graham, 1997), o DNA das células UR é limitado a codificar a sequência de 3051 pb que consiste em um fragmento menor, necessário para codificar os genes E1A e E1B (Chroboczek, Bieber e Jacrot, 1992).

A produtividade dos vetores adenovirais na linhagem UR foi comparada com a da HEK293 em ensaios de pequena e larga escala. Os resultados sugerem que as quantidades de vírus obtidos em ambas são similares, confirmando que as células UR também são eficientes para produzir adenovírus. A análise após 10 passagens de produção dos vetores adenovirais confirma que o produto viral obtido na UR estava livre de RCAs, enquanto que os adenovírus produzidos na HEK293 geraram RCA já durante a quarta passagem (Xu *et al.*, 2006).

Farson *et al.* (2006) desenvolveram células produtoras de adenovírus livres de RCA. Foi utilizado um sistema eficiente de transdução retroviral rkat43.2 (Finer *et al.*, 1994) para gerar vetores destinados à expressão do gene E1. Para tanto, foram construídos os plasmídeos rkat43.2E1A (nucleotídeos 548-1575 do

Ad5) e rkat43.2E1B (nucleotídeos 1682-3825 do Ad5). Sobrenadantes contento alto título de retrovírus foram obtidos por meio de cotransfecção transiente dos plasmídeos rkat43.2E1A e rkat43.2E1B com plasmídeos empacotadores MMLV, como previamente descrito (Roberts *et al.*, 1994). Assim, foram produzidos os retrovírus MMLV-E1A e MMLV-E1B utilizados para cotransduzir as células A549, derivados de carcinoma de pulmão de humano; dois clones, 51 (Ac51) e 139 (Ac139), foram selecionados. Para avaliar a produção de adenovírus os autores testaram as células complementares de E1, Ac51 e Ac139 (tanto em meio contendo soro, como em meio livre de soro) em comparação com as linhagens HEK293 e Per.C6 para produção de adenovírus E1-deficientes. Comparado com a dose de infecção inicial, ambos, Ac51 e Ac139, alcançaram níveis similares aos das produções obtidas linhagens HEK293 e Per.C6 em ambas as condições. A expressão das proteínas E1A e E1B foi confirmada por meio de ensaio de *Western blot* em ambos os clones obtidos. As células das linhagens Ac51 e Ac139 apresentam como principal vantagem característica, a separação genômica dos genes E1A e E1B, que foi possível graças ao uso da cotransfecção dos vetores retrovirais contendo os genes E1A e E1B separadamente, ou seja, um em cada vetor, o que consequentemente acarretou na integração das sequências gênicas de E1A e E1B em locais distintos do genoma celular (Farson *et al.*, 2006).

Ensaios para detecção da presença de RCA foram realizados em diferentes linhagens celulares: Ac51, Ac139, 293 e Per.C6, submetidas a 20 passagens de produção. Os resultados de análises da presença de RCA, obtidos por meio de PCR, demonstraram a presença de RCA na produção de adenovírus nas células HEK293 nas passagens entre 9 e 18, enquanto que nas células Ac51 e Ac139 não foram detectados sinais da presença de RCAs. Na linhagem Per.C6, sinais positivos da presença de RCAs foram observados na produção dos vetores adenovirais a partir da passagem 18 e 20 (Farson *et al.*, 2006).

A estratégia de utilização de 2 vetores retrovirais, integrando os genes E1A e E1B em locais separados do genoma celular demonstrou ser eficiente no desenvolvimento de uma linhagem E1 complementar que suporta a produção de vetores adenovirais E1-defectivos, livre de RCA, em suspensão, adequada para produção adenoviral em larga escala (Farson *et al.*, 2006).

Quadro 1: Principais linhagens celulares produtoras de adenovírus.

Linhagens empacotadoras	Tipo de cultura	Método utilizado na transformação	Sequência contida do Ad5	Célula/linhagem de origem	Referências
HEK293	Aderida e suspensão	Transfecção com fosfato de cálcio	Nucleotídeos de 1-4344	Células embrionárias de rim humano	Graham <i>et al.</i> , 1977
911	Aderida	Transfecção com fosfato de cálcio	Nucleotídeos de 79-5789	Células de retinoblastos embrionários humanos	Fallaux <i>et al.</i> , 1996
NCL A549	Aderida	*	Nucleotídeos de 505-4034	Linhagem A549 de células de carcinoma pulmonar humano	Imler <i>et al.</i> , 1996
Per.C6	Suspensão	Transfecção com fosfato de cálcio	Nucleotídeos de 450-3510	Células de retinoblastos embrionários humanos	Fallaux <i>et al.</i> , 1998
Hela-E1	Aderida	Lipofecção	Nucleotídeos de 542-3504	Linhagem Hela de células de câncer cervical humano	Kim <i>et al.</i> , 2001
UR	Suspensão	Lipofecção	Nucleotídeos de 459-3510	Linhagem HEL 299, de pulmão embrionário humano	Xu <i>et al.</i> , 2006
Ac51 e Ac139	Suspensão	Cotransfecção retroviral	Nucleotídeos de 548-1575 e de 1628-3825	Linhagem A549 de células de carcinoma pulmonar humano	Farson <i>et al.</i> , 2006

* Informação não obtida

1.4 Y79: Células de escolha para o desenvolvimento de uma nova linhagem empacotadora de adenovírus livre de RCA

A linhagem Y79 foi gerada a partir de células de retinoblastoma humano e isolada por Reid e colaboradores a partir de um explante de tumor primário (Reid et al., 1974). Através de investigações de deleções citogenéticas, foi possível relacionar a banda q14 do cromossomo 13 como o *locus* genético que determina a suscetibilidade ao retinoblastoma (Lee et al., 1987). O retinoblastoma, classificado como um tumor neuroectodermal primitivo, é o tumor intraocular infantil mais comum. O câncer surge na retina, em células da camada receptora visual (Macfall, Sery e Makadon, 1977).

O retinoblastoma é um modelo protótipo biológico para o estudo de oncogenes recessivos. Este tumor maligno, que acomete olhos de crianças, pode ser explicado como o resultado de duas alterações genéticas distintas, cada uma causando a perda de função de uma das duas cópias homólogas em um único *locus* genético, Rb, atribuído à banda q14 do cromossomo 13 humano. A mutação que afeta este *locus* pode ser herdada de um dos progenitores, pode surgir durante a gametogênese ou ocorrer somaticamente. Os indivíduos que herdam um alelo mutante neste *locus* apresentam uma alta incidência de tumores secundários, não-oculares (Friend et al., 1986).

A linhagem Y79 apresenta como características morfológicas predominantes células indiferenciadas, pequenas, arredondadas, com pouco citoplasma e um grande núcleo hiperclorâmico que em geral possui ≥ 2 nucléolos proeminentes, podendo-se ainda encontrar células binucleadas. Geralmente as células crescem dispostas como agregados celulares que se assemelham a um cacho de uvas (Reid et al., 1974). A Figura 6A apresenta imagem de microscopia de contraste de fase de células Y79.

Outra linhagem celular derivada de retinoblastoma, denominada WERI-Rb1, foi estabelecida e tem sido mantida *in vitro* desde 1974. Estudos demonstraram que, morfologicamente, ambas as linhagens são semelhantes, e que crescem espontaneamente em suspensão (McFall, Sery e Makadon, 1977).

Shaw *et al.* (2002) sugeriram que adenovírus humanos transformam preferencialmente linhagens celulares neuronais humanas e demonstraram que as células HEK293, amplamente utilizadas para produção de vetores adenovirais, apresentam características neuronais (Shaw *et al.*, 2002). A linhagem Y79 vem sendo extensivamente estudada há mais de 35 anos. Estudos clonais indicam que estas células permanecem em um estado pluripotente, apresentando propriedades de tipos celulares gliais e neuronais (Rajagopalan *et al.*, 1993; White, Taylor e Pittler; 2001), sendo esta, portanto, uma importante característica para o desenvolvimento de uma linhagem empacotadora.

Estudos demonstraram que CAR está expresso em células da retina humana, e que os vetores adenovirais testados transduziram eficientemente *in vitro*, tanto células de retina como de retinoblastoma humano da linhagem Y79, havendo também avaliado e confirmado o eficiente nível de expressão dos transgenes (Mallam *et al.*, 2004). A linhagem Y79 apresenta-se, portanto, como opção vantajosa inerente a este projeto, dada sua alta permissividade à transdução adenoviral.

Dentre as vantagens apresentadas pela Y79, destaca-se ainda a inativação mutacional da proteína supressora de tumor pRb, fazendo com que consequentemente na linhagem alvo deste projeto LEY79 (LTR E1 Y79) toda proteína E1A expressa seja destinada à produção de partículas adenovirais e não para a imortalização celular (Zhang, Stevens e Madigan, 2001). A pRb exibe múltiplas atividades biológicas, incluindo o controle do ciclo celular, diferenciação e indução de apoptose (Zheng , 2001; Zhang , 2001; Harrington, 1998; Flatt, 2000).

Estudos confirmaram a possibilidade de aumento na escala de produção em biorreator para células que são cultivadas em suspensão e em meio livre de soro (Cotê *et al.*, 1998; Farson *et al.*, 2006). Portanto, além de suas características genéticas, a linhagem Y79 preenche os requerimentos da indústria de biofármacos por estar adaptada à proliferação em suspensão, essencial para a manutenção da cultura em biorreatores. Neste contexto, o presente estudo contribui para o desenvolvimento biotecnológico de construção de uma nova linhagem produtora de adenovírus.

6 CONCLUSÕES

A comprovação da aptidão da linhagem LEY79 em produzir partículas adenovirais sugere que os genes E1A e E1B estão sendo expressos, o que demonstra a eficiência da transferência gênica mediada pelo vetor retroviral pCLXSN. A abordagem utilizada na construção das linhagens produtoras de adenovírus HEK293, Per.C6 e HEL299 enfatiza a possibilidade de obtenção de linhagens através do método de transferência gênica por técnicas de transfecção. Portanto, a utilização do método de lipofecção nos permitirá almejar a inserção dos genes E1A e E1B nas células Y79 de forma estável.

Acreditamos que para uma abordagem racional de desenvolvimento de uma nova linhagem celular se requer ainda um entendimento detalhado do mecanismo e cinética de interação entre o vetor retroviral, célula empacotadora e a célula-alvo. Experimentos complementares no que tange à produção de adenovírus são necessários para avaliar a efetividade da capacidade da linhagem LEY79 em produzir vetores adenovirais defectivos em E1.

A produção de vetores adenovirais utiliza diversas estratégias, com grandes empenhos direcionados ao aprimoramento do processo de obtenção deste produto, todavia, o objetivo final é um só: vetores seguros e aptos à utilização no tratamento de patologias humanas. Dada a importância do processamento transcricional realizado por células humanas na atividade biológica, secreção e meia-vida das proteínas, linhagens celulares humanas têm sido adaptadas para expressar enzimas envolvidas nas modificações postranscpcionais das proteínas, como é o caso da linhagem Per.C6 (Coté *et al.*, 1998; Havenga *et al.*, 2008). Com base nestes conhecimentos, pode-se ambicionar a utilização da linhagem LEY79 associada aos vetores adenovirais também para a produção de proteínas recombinantes.

Os vetores adenovirais, atualmente, são os mais utilizados em protocolos clínicos, apresentando resultados promissores e, portanto, ganhando maior interesse, mesmo apresentando ainda grandes desafios. Segundo dados fornecidos pelo *Journal of Gene Medicine* em 2009, 377 protocolos clínicos experimentais de

terapia gênica em andamento no mundo, representando 24% destes, utilizam vetores adenovirais (Edelstein, 2009).

Este projeto envolveu etapas, desde a construção do vetor contendo as sequências dos genes E1A e E1B, realizada de forma a obter uma linhagem produtora de adenovírus sem capacidade replicativa, produção de retrovírus, caracterização do vetor, até testes de produção destes vetores em comparação com a HEK293A. A realização deste projeto tem como meta o desenvolvimento de uma ferramenta biológica acessível, que pode vir a compor um produto biotecnológico comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- Akusjarvi G. Temporal regulation of adenovirus major late alternative RNA splicing. *Front Biosci.* 2008;13:5006-15.
- Baigelman MC, Costanzi-Strauss E, Strauss BE. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. *J Biotechnol.* 2003;103:97-106.
- Berk AJ. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene.* 2005;24:7673-85. Review.
- Brockmann D, Schmidtmann A, Fürst S, Tries B, Esche E. Cloning of adenovirus type 12 E1 genes into a retroviral vector and their differential splicing in mouse cells. *Gene.* 1990;91:167-72.
- Cáceres JF, Stamm S, Helfman DM, Krainer AR. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science.* 1994; 265:1706-9.
- Chroboczek J, Bieber F, Jacrot B. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology.* 1992;186:280-5.
- Chu RL, Post DE, Khuri FR, Van Meir EG. Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;155:299-312.
- Cortin V, Thibault J, Jacob D, Garnier A. High-titer adenovirus vector production in 293S cell perfusion culture. *Biotechnol Prog.* 2004;20:858-63.
- Coté J, Garnier A, B. Massie, A. Kamen, Serum-free production of recombinant proteins and adenoviral vectors by 293SF-3F6 cells. *Biotechnol Bioeng.* 1998;59:567-75.
- Danthinne X, Imperiale MJ. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* 2000;7:1707–1714.

¹ International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003 – Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Edelstein M. Journal of Gene Medicine Web site. Disponível em: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>. [15 Jan 2009].

Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 1998;9:1909-17.

Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC, Van Der Eb AJ. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* 1996;7:215-22.

Farson D, Tao L, Ko D, Li Q, Brignetti D, Segawa K, Mittelstaedt D, Harding T, Yu DC, Li Y. Development of novel E1-complementary cells for adenoviral production free of replication-competent adenovirus. *Mol Ther.* 2006;14:305-11.

FDA - U.S. Food and Drugs Administration. Recomendation on RCA limit. Disponível em: <http://www.fda.gov>. [08 jul.2009].

Finer MH, Dull TJ, Qin L, Farson D, Roberts MR. kat: a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood.* 1994;83:43-50.

Flatt PM, Tang LJ, Scatena CD, Szak ST, Pietenpol JA. p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol.* 2000;20:4210-23.

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 1986;323:643-6.

Gattoni R, Schmitt P, Stevenin J. In vitro splicing of adenovirus E1A transcripts: characterization of novel reactions and of multiple branch points abnormally far from the 3' splice site. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:2389-409.

Ginsberg HS. The ups and downs of adenovirus vectors. *Bull N Y Acad Med.* 1996;73:53-8. Review.

Graham FL, Smiley J., Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36:59-74.

Gregório JC, Costanzi-Strauss E. Construction and production of bicistronic Adp16IRESp53. In: 4th Congress of Pharmaceutical Sciences; Ribeirão Preto; 2003. Braz J Pharm Sci. 39:73.

Harrington EA, Bruce JL, Harlow E, Dyson N. pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:11945-50.

Havenga MJ, Holterman L, Melis I, Smits S, Kaspers J, Heemskerk E, van der Vlugt R, Koldijk M, Schouten GJ, Hateboer G, Brouwer K, Vogels R, Goudsmit J. Serum-free transient protein production system based on adenoviral vector and PER.C6 technology: high yield and preserved bioactivity. Biotechnol Bioeng. 2008; 00:273-83.

Hehir KM, Armentano D, Cardoza LM, Choquette TL, Berthelette PB, White GA, Couture LA, Everton MB, Keegan J, Martin JM, Pratt DA, Smith MP, Smith AE, Wadsworth SC. Molecular Characterization of Replication-Competent Variants of Adenovirus Vectors and Genome Modifications To Prevent Their Occurrence. J Virol. 1996;70:8459-67.

Henry O, Dormond E, Perrier M, Kamen A. Insights into adenoviral vector production kinetics in acoustic filter-based perfusion cultures. Biotechnol Bioeng. 2004;86:765-74.

Imler JL, Bout A, Dreyer D, Dieterlé A, Schultz H, Valerio D, Mehtali M, Pavirani A. Trans-complementation of E1-deleted adenovirus: a new vector to reduce the possibility of codissemination of wild-type and recombinant adenoviruses. Hum Gene Ther. 1996;6:711-21.

Iyer P, Ostrove JM, Vacante D. Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production. Cytotechnology. 1999;30:169-72.

Kamen A, Henry O. Development and optimization of an adenovirus production process. J Gene Med. 2004;1:S184-92

Kaelin WG Jr. Choosing anticancer drug targets in the postgenomic era. J Clin Invest. 1999;104:1503-6

Kim JS, Lee SH, Cho YS, Park K, Kim YH, Lee JH. Development of a packaging cell line for propagation of replication-deficient adenovirus vector. Exp Mol Med. 2001; 33:145-9.

Lai Y, Drobinskaya I, Kolossov E, Chen C, Linn T. Genetic modification of cells for transplantation. *Adv Drug deliv Rev.* 2008;14:146-59.

Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science.* 1987; 3:1394-9.

Liu H, Liu XM, Li SC, Wu BC, Ye LL, Wang QW, Chen ZL. A high-yield and scaleable adenovirus vector production process based on high density perfusion culture of HEK 293 cells as suspended aggregates. *J Biosci Bioeng.* 2009;107:524-9.

Louis N, Evelegh C, Graham FL. Cloning and Sequencing of the Cellular–Viral Junctions from the Human Adenovirus Type 5 Transformed 293 Cell Line. *Virology.* 1997;233:423-9.

Lowe SW, Ruley HE. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* 1993;7:535-45.

Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13:77-83.

Mallam JN, Hurwitz MY, Mahoney T, Chévez-Barrios P, Hurwitz RL. Efficient gene transfer into retinal cells using adenoviral vectors: Dependence on receptor expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:1680-7.

Maranga L, Aunijs JG, Zhou W. Characterization of changes in PER.C6 cellular metabolism during growth and propagation of a replication-deficient adenovirus vector. *Biotechnol Bioeng.* 2005;90:645-55.

McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2004; 15:1022-33.

MacFall RC, Sery TW, Makadon M. Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res.* 1977;37:1003-10.

Meneses-Acosta A, Dormond E, Jacob D, Tom R, Bernier A, Perret S, St-Laurent G, Durocher Y, Gilbert A, Kamen A. Development of a suspension serum-free helper-dependent adenovirus production system and assessment of co-infection conditions. *J Virol Methods.* 2008;148:106–114.

Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol*. 1990;10:4239-42 Erratum in: *Mol Cell Biol*. 1992;12:433.

Mizuguchi H, Kay MA, Hayakawa T. Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;52:165-76. Review.

Nadeau I, Kamen A. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol Adv*. 2003;20:475-89

Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verma IM. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol*. 1996;70:5701-5.

Nemerow GR, Stewart PL. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63:725-34.

Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 10:699-703
O'Connor TP, Crystal RG. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet*. 2006;7:261-76.

Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ. Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods*. 2001;112:95-9.

Rajagopalan S, Rodrigues M, Polk T, Wilson D, Chader GJ, Hayden BJ. Modulation of retinoblastoma cell characteristics by hexamethylene bis-acetamide and other differentiating agents in culture. *J Histochem Cytochem*. 1993;41:1331-7.

Reid TW, Albert DM, Rabson AS, Russell P, Craft J, Chu EW, Tralka TS . Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 1974;53:347-60.

Roberts MR, Qin L, Zhang D, Smith DH, Tran AC, Dull TJ, Groopman JE, Capon DJ, Byrn RA, Finer MH. Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood*. 1994;84:2878-89.

Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, Wickham TJ. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*. 1998;72:7909-15.

Roitsch C, Achstetter T, Benchaibi M, Bonfils E, Cauet G, Gloeckler R, L'h te H, Keppi E, Nguyen M, Spehner D, Van Dorsselaer A, Malarme D. Characterization and quality control of recombinant adenovirus vectors for gene therapy. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;752:263-80.

Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000;81:2573-604

Sambrook J, Fristch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Schmitt P, Gattoni R, Keohavong P, Stévenin J. Alternative splicing of E1A transcripts of adenovirus requires appropriate ionic conditions in vitro. *Cell.* 1987;50:31-9.

Schoofs G, Monica TJ, Ayala J, Horwitz J, Montgomery T, Roth G, Castillo FJ. A high-yielding serum-free, suspension cell culture process to manufacture recombinant adenoviral vectors for gene therapy. *Cytotechnology.* 1998;28:81-9.

Schwartz RA, Lakdawala SS, Eshleman HD, Russell MR, Carson CT, Weitzman MD. Distinct requirements of adenovirus E1b55K protein for degradation of cellular substrates. *J Virol.* 2008;82:9043-55.

Segura MM, Alba R, Bosch A, Chillón M. Advances in helper-dependent adenoviral vector research. *Curr Gene Ther.* 2008;8:222-35.

Setor de Sequenciamneto de DNA . Centro de Estudos Do genoma humano, IB-USP (2009). Disponível em: <http://genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento.php>. [05 jul. 2009].

Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* 2002;16:869-71.

Southgate T, Kroeger KM, Liu C, Lowenstein PR, Castro MG. Gene transfer into neural cells in vitro using adenoviral vectors. *Curr Protoc Neurosci.* 2008;4:.23

Strain AJ. The uptake and fate of exogenous cellular DNA in mammalian cells. *Dev Biol (Basel).* 2006;123:23-8.

Teodoro JG, Branton PE . Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol.* 1997;71:1739-46.

Tsao YS, Condon R, Schaefer E, Lio P, Liu Z. Development and improvement of a serum-free suspension process for the production of recombinant adenoviral vectors using HEK293 cells. *Cytotechnology.* 2001;37:189-98.

Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:711-38

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. 2nd ed. New York ; 1992. Scientific American Books.

White E. Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus, *Proc Soc Exp Biol Med.* 1993; 204:30-9.

White E, Cipriani R. Role of adenovirus E1B proteins in transformation: altered organization of intermediate filaments in transformed cells that express the 19-kilodalton protein. *Mol Cell Biol.* 1990;10:120-30.

White JB, Taylor RE, Pittler SJ. Reproducible high efficiency gene transfer into Y79 retinoblastoma cells using adenofection. *J Neurosci Methods.* 2001;30:1-7.

Wu N, Ataai MM. Production of viral vectors for gene therapy applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2000;11:205-8.

Xu Q, Arevalo MT, Pichichero ME, Zeng M. A new complementing cell line for replication-incompetent E1-deleted adenovirus propagation. *Cytotechnology.* 2006;51:133-40.

Xu ZL, Mizuguchi H, Sakurai F, Koizumi N, Hosono T, Kawabata K, Watanabe Y, Yamaguchi T, Hayakawa T. Approaches to improving the kinetics of adenovirus-delivered genes and gene products. *Adv Drug Deliv. Rev.* 2005;57:781–802.

Yang Y, Li Q, Ertl HC, Wilson JM. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol.* 1995;69:2004-15

Yomoda J, Muraki M, Kataoka N, Hosoya T, Suzuki M, Hagiwara M, Kimura H. Combination of Cdk family kinase and SRP75 modulates alternative splicing of Adenovirus E1A. *Genes Cells*. 2008;13:233-44.

Yu SS, Kim JM, Kim S. High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Ther*. 2000;7:797-804.

Zantema A, Fransen JA, Davis-Olivier A, Ramaekers FC, Vooijs GP, DeLeys B, Van der Eb AJ. Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology*. 1985;142:44-58.

Zhang M, Stevens G, Madigan MC. In vitro effects of radiation on human retinoblastoma cells. *Int J Cancer*. 2001;96:7-14.

Zheng L, Lee WH. The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res*. 2001;264:2-18

Zhu J, Grace M, Casale J, Chang AT, Musco ML, Bordens R, Greenberg R, Schaefer E, Indelicato SR. Characterization of replication-competent adenovirus isolates from large-scale production of a recombinant adenoviral vector. *Hum Gene Ther*. 1999; 10:113-21.

