DANIEL VIEIRA CONDE OLIVEIRA

**Secreção de *Gaussia* luciferase como indicador de atividade de caspase-3/7 em resposta
ao tratamento com AdCDKN2A^{IRES}p53 em glioblastoma multiforme**

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: Profa. Dra. Eugenia Costanzi-Strauss.

Versão corrigida parcial.

São Paulo

2018

RESUMO

OLIVEIRA D. V. C. Secreção de *Gaussia* luciferase como indicador de atividade de caspase-3/7 em resposta ao tratamento com AdCDKN2A^{IRES}p53 em glioblastoma multiforme. 2018. 146 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Este trabalho descreve a remediação simultânea de dois genes supressores de tumor, CDKN2A e p53, em três linhagens celulares derivadas de glioblastoma multiforme: U87 (CDKN2A^{-/-}, p53^{wt/wt}), U251 (CDKN2A^{-/-}, p53^{mut/mut}) e T98G (CDKN2A^{-/-}, p53^{mut/mut}). A entrega gênica foi mediada por vetor adenoviral bicistrônico contendo o cassete CDKN2A^{IRES}p53, capaz de expressar as duas proteínas simultaneamente. Vetores monocistrônicos também foram testados (AdCDKN2A e Adp53). Visando detectar apoptose, as linhagens receberam o sensor de atividade de caspase-3/7 GFP-DEVD-ssGLUC por transdução lentiviral. Este possui *Gaussia* luciferase (GLUC) C-terminal, que é secretada após ativação de caspases e pode ser dosada no sobrenadante. Após a marcação, realizaram-se ensaios de viabilidade celular, proliferação, formação de colônias, senescência, ciclo celular e dosagem de GLUC após remediação dos genes supressores de tumor nas linhagens GBM^{DEVD-GLUC}. Com ensaio de viabilidade, observou-se efeito citotóxico do vetor bicistrônico AdCDKN2A^{IRES}p53 maior que a soma dos obtidos com cada tratamento monocistrônico. No ensaio de senescência, o vetor AdCDKN2A resultou na maior indução do fenótipo senescente em todas as linhagens, seguido por Adp53, enquanto AdCDKN2A^{IRES}p53 produziu resultados similares a um desses dois perfis em cada linhagem. Dosagem de GLUC no sobrenadante foi usada como indicador para atividade de caspase-3/7 após tratamento com os vetores supressores de tumor. O controle AdLacZ resultou em atividade de GLUC maior que nas amostras sem vírus (*mock*), enquanto tratamento com AdCDKN2A obteve resultados maiores que o controle em 72 h nas três linhagens. O vetor AdCDKN2A^{IRES}p53 alcançou, inesperadamente, resultados variados em 72 h. Os dados obtidos neste trabalho indicam que a remediação simultânea de CDKN2A e p53 possui notável ação antiproliferativa tumoral, podendo levar à morte ou à senescência celular. Também é apontado que o sensor de caspase-3/7 GFP-DEVD-ssGLUC é robusto, mas detecta não apenas a indução de apoptose, mas a combinação de todos os processos ativadores de caspases em uma amostra.

Palavras-chave: Genes supressores de tumor. Câncer. Terapia gênica. Luciferase. Adenovírus.

ABSTRACT

OLIVEIRA D. V. C. *Gaussia* luciferase secretion as an indicator of caspase-3/7 activity in response to treatment with AdCDKN2A^{IRES}p53 in glioblastoma multiforme. 2018. 146 p. Dissertation (Masters in Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

This thesis describes the simultaneous remedy of two tumor suppressor genes, CDKN2A and p53, in three glioblastoma multiforme (GBM)-derived cell lines: U87 (CDKN2A^{-/-}, p53^{wt/wt}), U251 (CDKN2A^{-/-}, p53^{mut/mut}) and T98G (CDKN2A^{-/-}, p53^{mut/mut}). Gene delivery was mediated by a bicistronic adenoviral vector bearing the sequence CDKN2A^{IRES}p53, which simultaneously expresses both proteins. Monocistronic vectors were also tested (AdCDKN2A and Adp53). To detect apoptosis, the GBM cell lines received caspase-3/7 sensor GFP-DEVD-ssGLUC via lentiviral transduction. This sensor has a C-terminal *Gaussia* luciferase (GLUC), which is secreted by the cell after caspase activation and can be measured in the supernatant. After sensorization, functional assays were carried out, including cell viability, proliferation, colony formation, cell senescence, cell cycle and GLUC measure after treatment with the tumor suppressor vectors in GBM^{DEVD-GLUC} lineages. Viability assay with the AdCDKN2A^{IRES}p53 vector resulted in a remarkable cytotoxic effect, greater than the sum of the effects with each monocistronic treatment. In the senescence assay, vector AdCDKN2A yielded the highest induction of cell senescence in all lineages, followed by Adp53, while AdCDKN2A^{IRES}p53 induced results that followed one of these two profiles in each cell line. GLUC measure was an indicator of intracellular caspase-3/7 activity after treatment with the tumor suppressor vectors. Control vector AdLacZ resulted in higher GLUC activity than *mock* treatment in all three cell lines, while AdCDKN2A treatment showed results bigger than control at 72 h in all cell lines. Bicistronic vector AdCDKN2A^{IRES}p53 reached, unexpectedly, varied results at 72 h in all cell lines. Data obtained in this study indicate that simultaneous remedy of CDKN2A and p53 has remarkable antiproliferative activity in GBM cells, resulting in cell death or cell senescence. It is also shown that caspase-3/7 sensor GFP-DEVD-ssGLUC is a robust tool, but its results detect not only a single cellular process, such as apoptosis, but the combination of all caspase-activating processes in a cell population.

Keywords: Tumor suppressor genes. Cancer. Gene therapy. Luciferase. Adenovirus.

INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo Celular

A proliferação de células eucarióticas depende de uma série de eventos intracelulares altamente coordenados que em conjunto são denominados “ciclo da divisão celular”. Este ciclo é classicamente dividido em 4 fases, G_1 , S, G_2 e M (mitose), nas quais a célula recebe sinais e desencadeia reações que a preparam para a fase seguinte. Na fase G_1 a célula recebe sinais extracelulares pró- e antimitogênicos, permitindo que o microambiente extracelular exerça influência sobre sua decisão de se dividir. Em determinado momento de G_1 , se os impulsos pró-mitogênicos prevalecerem, a célula se compromete irreversivelmente com a divisão e inicia sua transição para S. Caso prevaleçam sinais antimitogênicos, a célula entra em estado de quiescência ou de sequestro em G_1 . Em organismos multicelulares, a maioria das células diferenciadas é quiescente, escapando do ciclo e entrando em G_0 , uma fase estacionária em que permanecem metabolicamente ativas e exercem funções especializadas.

Durante a fase S (fase de síntese) e já independente de fatores externos, a célula duplica seu material genético. A duplicação do genoma ocorre uma vez por ciclo, e, quando termina, leva à fase G_2 . Nesta fase a célula também pode receber sinais mitogênicos e inibitórios, que influenciarão na decisão de proliferar das células-filhas (NAETAR *et al.*, 2014; SPENCER *et al.*, 2013). Em G_2 a célula também se prepara para a mitose (M), fase na qual ocorre a divisão física da célula em duas células-filhas e o material genético previamente duplicado é distribuído igualmente entre elas.

A progressão do ciclo celular é mediada pela ativação coordenada e fase-dependente de diversos atores, em geral proteínas efetoras e fatores de transcrição. Tal ativação é regida por quinases dependentes de ciclinas (CDKs – *Cyclin Dependent Kinases*), que fosforilam sítios de serina/treonina em proteínas-alvo e as ativam, passando a ter ação dentro da célula e podendo ser responsáveis pela regulação de outras enzimas e genes de controle do ciclo celular.

CDKs são inativas em estado monomérico e, como o nome indica, sua atividade catalítica depende de dimerização com ciclinas, suas unidades reguladoras. A expressão de CDKs é relativamente constante ao longo do ciclo, ao passo que a expressão de ciclinas é ordenada e fase-específica. Em trabalho publicado no periódico *PLOS Science*, Gookin e colegas (2017)

utilizaram técnicas não-invasivas baseadas em células individuais, incluindo um sensor fluorescente inovador de atividade de CDK2, para detectar diversas moléculas e localizá-las temporalmente ao longo do ciclo com precisão inédita (figura 1).

Devido às estratégias adotadas, baseadas amplamente em fluorescência, não foi necessária intervenção externa nas amostras, e, portanto, trata-se da dinâmica natural do ciclo não-perturbado. Em células ciclando, ciclina A2 inicia sua expressão na fase S e continua a crescer até M, quando é degradada. Ciclina B1 segue padrão similar, iniciando sua expressão ao final de S, crescendo em G₂, e sofrendo degradação ao final de M. A fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb; ver item 1.1.1) aumenta constantemente durante o ciclo e se recicla em M. Ciclina E inicia sua atividade logo antes de M da célula-mãe e continua aumentando gradativamente em G₁ das células-filhas, até ser degradada em S. Por fim, ciclina D1 inicia sua expressão em G₂, alcança um pico em M, e, no ciclo seguinte, é degradada ao longo de G₁ (figura 1).

A atividade catalítica dos complexos ciclina:CDK é regulada negativamente por inibidores de ciclina:CDK (CDKIs; ver item 1.1.2). A alta expressão do CDKI p21^{Cip1} em G₂ do ciclo anterior foi apontada pelos autores (GOOKIN *et al.*, 2017; SPENCER *et al.*, 2013) como fator determinante para que a célula entre em estado quiescente espontâneo no ciclo seguinte. Os autores também demonstram que células espontaneamente quiescentes conseguem reentrar no ciclo em G₁, e, quando o fazem, a expressão de ciclinas volta a seguir o padrão natural do ciclo e a expressão de p21^{Cip1} cessa.

Figura 1 Expressão de ciclinas ao longo do ciclo celular, adaptado de Gookin *et al.* 2017. O trabalho utilizou metodologias não-invasivas baseadas em células individuais para detectar a fase do ciclo em que a célula se encontra, medir a expressão de 14 moléculas (das quais cinco estão mostradas aqui; a linha pRb indica a fosforilação em serina 780), e posicionar cada uma em sua fase correspondente. Cyc: ciclina.

1.1.1 Proteína do Retinoblastoma

O regulador central da progressão de G₁ e da transição G₁/S é a proteína do retinoblastoma (pRb). O gene *RB1*, codificante para pRb, foi inicialmente identificado em crianças suscetíveis a retinoblastoma hereditário (tumor que batizou o gene e a proteína), e sua falta foi rapidamente apontada como evento inicial na progressão da doença (KNUDSON, 1971, 1984). A caracterização inicial da proteína focou em sua função supressora de tumor, devido à sua capacidade de barrar G₁ ao inibir a atividade de fatores E2F, responsáveis pela ativação de genes de síntese de DNA e outras funções de G₁/S.

Como supressor de tumor, perda do gene *RB1* aumenta o risco de desenvolvimento de osteosarcoma em crianças e adolescentes (CORSON; GALLIE, 2007; DIMARAS *et al.*, 2008; KNUDSON, 1984), e o gene se encontra inativado em 90% dos carcinomas pulmonares de células pequenas (NSCLC - *Non Small Cell Lung Carcinoma*; MEUWISSEN *et al.* 2003). Em adultos, expressão da proteína viral E7 do Vírus do Papiloma Humano (HPV) pode causar carcinoma cervical por inativação de pRb (DOORBAR, 2006; PEREZ-ORDONEZ, 2006). Adenovírus utilizam a proteína viral E1A de maneira análoga (ZAMANIAN; LA THANGUE, 1992); e mecanismos similares de inativação de pRb possivelmente são empregados em neoplasias virais de fígado (MUNAKATA *et al.*, 2007).

Com massa molecular de 105 kDa, pRb possui 16 sítios de fosforilação ao longo de sua cadeia aminoacídica, dos quais 14 são fosforilados por CDKs (BURKHART; SAGE, 2008). A isoforma não-fosforilada de pRb se manifesta brevemente logo após o fim da mitose (NARASIMHA *et al.*, 2014), e está envolvida com a saída do ciclo em células quiescentes. Em seu estado hipofosforilado, pRb sequestra fatores de transcrição da família E2F, retardando a progressão do ciclo celular. Em seu estado hiperfosforilado, presente ao final de G₁ e no decorrer do ciclo, pRb é inativada e deixa de interagir com E2F, permitindo que este dê seguimento à transição G₁/S.

O início da fosforilação de pRb depende de ciclinas D e de seus complexos ciclina D:CDK4/6. Ciclinas D possuem meia-vida menor que 15 minutos, e, portanto, sua ação depende de estabilização intracelular (LUNDBERG; WEINBERG, 1998a). A expressão de ciclinas D é controlada por estímulos proliferativos mediados por fatores de crescimento celular, como os sinais das vias RAS/RAF/MAPK. Em contrapartida, sinais inibitórios, como TGF- β e inibição por contato, levam à sua regulação negativa (SHERR; ROBERTS 1999).

Durante G₁, ciclina D:CDK4/6 inicia a fosforilação de pRb (EZHEVSKY *et al.*, 1997; KITAGAWA *et al.*, 1996), cuja fosforilação progressiva ocasiona a liberação de fatores E2F, reguladores da transcrição de ciclinas E. Ainda em G₁, ciclinas E dimerizam-se com CDK2, formando complexos responsáveis pela hiperfosforilação e inativação completa de pRb, o que causa maior liberação de fatores E2F, gerando um ciclo de retroalimentação positiva que leva à transição G₁/S e impede que a célula retorne a G₁ (EZHEVSKY *et al.*, 1997, 2001; KEENAN; LENTS; BALDASSARE, 2004; LUKAS *et al.*, 1995; LUNDBERG; WEINBERG, 1998b).

Em 2014, Steven Dowdy e colegas da Universidade da Califórnia em São Diego e da Escola de Medicina de Harvard esclareceram os mecanismos de fosforilação de pRb em G₁ (NARASIMHA *et al.*, 2014). O grupo se propôs a isolar e estudar as espécies de pRb presentes em G₁: pRb não-fosforilada, pRb hipofosforilada (resultante da ação inicial de ciclina D:CDK4/6) e pRb hiperfosforilada (resultante da ação de ciclina E:CDK2).

A origem do estudo se baseou no fato de que pRb não-fosforilada e pRb hipofosforilada são impossíveis de se separarem em SDS-PAGE de 1 dimensão (EZHEVSKY *et al.*, 1997, 2001). Assim, para isolar e caracterizar essas variantes, o grupo se utilizou de outra técnica, foco isoelétrico bidimensional (2D-IEF – *2-dimensional isoelectric focusing*), pela qual se permite separar proteínas pelo ponto isoelétrico em uma dimensão e pela massa molecular na outra.

O estudo concluiu que pRb se encontra exclusivamente monofosforilada em G₁ inicial, sem encontrar nenhuma evidência de hipofosforilação (mais de um e menos de catorze grupos fosfato) progressiva por ciclina D:CDK4/6. O grupo alcançou este notável resultado ao investigar 11 linhagens celulares tumorais e não-tumorais sob condições diversas, que incluíam assincronicidade, células em G₁ inicial, em G₁ tardia, e células seguidas cineticamente após sequestro em G₀. Utilizando inibidores de CDK4/6 e fibroblastos triplamente deletados para ciclinas D1, D2 e D3, a equipe demonstrou que ciclina D:CDK4/6 é o complexo responsável pela monofosforilação inicial de pRb. O complexo transfere grupo fosfato a pRb em 14 sítios diferentes, gerando 14 isoformas monofosforiladas independentes no início de G₁ (NARASIMHA *et al.*, 2014). Em G₁ tardia, o grupo demonstrou que complexos ciclina E:CDK2 realizam a hiperfosforilação de todas as isoformas monofosforiladas, preenchendo os 13 sítios de fosforilação restantes e inativando a molécula. Também se demonstrou que células que saem do ciclo entrando em G₀ apresentam apenas a isoforma não-fosforilada de pRb; e células sujeitas a dano ao DNA, mesmo em G₀, respondem ativando ciclina D:CDK4/6 e gerando isoformas monofosforiladas de pRb.

Estes achados, resumidos na figura 2, esclarecem a progressão de eventos em G₁ e levantam questões em relação à sua mecânica. Por exemplo: como ciclina D:CDK4/6 adiciona apenas um fosfato a pRb, deixando os outros 13 sítios intactos? E, se a hipofosforilação gradativa de pRb por ciclina D:CDK4/6 não ocorre, qual é o mecanismo inicial de ativação de ciclina E:CDK2?

Além da regulação de E2F, outros papéis de pRb também são conhecidos, incluindo controle da diferenciação celular durante a embriogênese e, em tecidos adultos, regulação negativa da apoptose, manutenção do estado quiescente e preservação da estabilidade genômica. Em revisão em que analisam essas informações, Burkhardt e Sage (2008) apontam um efeito aparentemente paradoxal da perda de pRb para a oncogênese. Os autores argumentam que, apesar desta perda impulsionar a progressão do ciclo celular e evitar o estado de quiescência, ela também aumenta morte celular e reparo de DNA (BILLECKE *et al.*, 2002; BOSCO, 2005; MACLEOD; HU; JACKS, 1996; PROST *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 1998). Isto indica que, no processo oncogênico, a perda de função de pRb é contexto-dependente, e há situações em que é evolutivamente vantajoso para o tumor mantê-la.

Um maior entendimento das interações entre os membros da família pRb, seus reguladores e seus ligantes é crucial para o desenho de terapias para tumores com alterações nessas vias. A caracterização das funções supressoras de tumor de pRb relevantes para cada tipo de

neoplasia (levando em conta o tecido originário e os estágios de progressão tumoral) é necessária para identificar compostos e estratégias de terapia gênica capazes de induzir quiescência ou morte celular.

Figura 2 Fosforilação de pRb em G₁ segundo Narasimha e colegas (2014). No estudo, os autores demonstraram que ciclina D:CDK4/6 causa a monofosforilação de pRb, gerando 14 isoformas diferentes correspondentes a cada sítio de fosforilação no início de G₁. Ciclina E:CDK2, então, hiperfosforila os 13 sítios restantes, inativando pRb e liberando fatores E2F, que dão prosseguimento à transição G₁/S. Foi demonstrado também que pRb não-fosforilada é a isoforma presente em G₀, e que ocorrência de dano ao DNA nessa fase resulta na monofosforilação de pRb por ciclina D:CDK4/6.

1.1.2 Regulação dos Complexos Ciclina:CDK

Os complexos ciclina:CDK têm importância central para o ciclo celular e são regulados por mecanismos de ativação e inibição. A atividade quinásica de CDKs requer fosforilação para expor seu sítio catalítico, que é mediada por quinases ativadoras de CDK (CAK – *CDK-Activating Kinase*). Outro mecanismo de regulação depende de proteínas inibidoras de CDKs, conhecidas como CDKIs (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitors*; PAVLETICH, 1999; MALUMBRES, 2014).

Existem duas famílias notáveis de CDKIs: INK4 e Cip/Kip. A família INK4 (CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C e CDKN2D, também denominados p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}, respectivamente) é composta por inibidores específicos de CDK4 e CDK6, que atuam bloqueando os sítios de ligação entre CDK4/6 e ciclina D (SERRANO *et al.*, 1993; GUAN *et al.*, 1994; MALUMBRES, 2014). Por serem específicos para ciclina D:CDK4/6, os inibidores dessa família possuem papel importante em G₁. p15^{INK4b} participa da via de inibição de crescimento desencadeada por TGF- β (HANNON; BEACH, 1994); p18^{INK4c} e p19^{INK4d} são expressos durante a fase embrionária de camundongos enquanto p16^{INK4a} e p15^{INK4b} são expressos durante a vida adulta (ZINDY *et al.*, 1997); p18^{INK4c} e p19^{INK4d} também são expressos periodicamente durante o ciclo, tendo seu pico durante a fase S (HIRAI *et al.*, 1995; CHAN *et al.*, 1995); p15^{INK4b} e p18^{INK4c} participam do processo de diferenciação de neurônios e mioblastos (RUAS; PETERS, 1998).

Os inibidores da família Cip/Kip são CDKN1A, CDKN1B e CDKN1C (conhecidos respectivamente como p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}) e possuem como alvos todos os complexos ciclina:CDK (GU *et al.*, 1993; POLYAK *et al.*, 1994; MATSUOKA *et al.*, 1995). Em células ciclando, unidades do inibidor p21^{Cip1} são encontradas formando estrutura quaternária com CDK1/2/4 e PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), uma subunidade de DNA-polimerase δ . A atividade inibitória de p21^{Cip1} sobre essa estrutura se inicia quando mais de uma unidade se liga à holoenzima, momento em que p21^{Cip1} passa a inibir sua atividade de síntese de DNA e barra o ciclo. A ligação de p21^{Cip1} a PCNA é chave pois impede sua atividade polimerizadora ao mesmo tempo que lhe permite participar do reparo de DNA. O fator de transcrição p53, ligado à resposta contra danos ao DNA, é precursor de p21^{Cip1}, tornando este o principal mediador entre p53 e o controle do ciclo celular após dano genômico (SHERR; ROBERTS, 1995; item 1.3).

CDKN1B ou p27^{Kip1} também se associa a complexos ciclina:CDK de forma inespecífica e sua expressão é controlada por TGF- β e pode barrar o ciclo em G₁. p27^{Kip1} é expresso principalmente em células que sofrem inibição de proliferação por contato e sua via de atuação não depende de pRb ou de p53 (POLYAK *et al.*, 1994). CDKN1C (p57^{Kip2}) também inibe o ciclo e é co-imunoprecipitado com ciclinas D:CDK4/6, ciclina E:CDK2 e ciclina A:CDK2. Assim como p27^{Kip1}, a via p57^{Kip2} não depende de pRb ou de p53 (SHERR; ROBERTS, 1995).

1.2 Proteína Supressora de Tumor CDKN2A (p16^{INK4a})

Como membro da família INK4, p16^{INK4a}, adiante referido como CDKN2A, é um CDKI atuante em CDK4/6 que impede a ligação destas unidades a ciclina D. Assim, CDKN2A causa parada do ciclo em G₁, impedindo a primeira fosforilação de pRb. Superexpressão de CDKN2A leva à senescência celular, processo no qual as células perdem a capacidade proliferativa, adquirem características morfológicas e de expressão gênica específicas, e que se acredita ser responsável pelo envelhecimento de organismos. Senescência celular também tem função protetora contra eventos oncogênicos (item 1.4).

CDKN2A está envolvido com diversas respostas antitumorais e é classificado como supressor de tumor. Expressão oncogênica de Ras, proto-oncogene essencial para a transição G₀/G₁ e para a progressão de G₁ (DOWNWARD, 1997; PEEPER; BERNARDS, 1997), provoca sequestro tardio em G₁ acompanhado de incremento de CDKN2A e p53, levando fibroblastos primários a um estado de senescência prematura, reação que não ocorre em células CDKN2A e p53-deficientes (SERRANO *et al.*, 1997). Inativação oncogênica de pRb por mutações ou pela ação de proteínas virais, como E7 de HPV-16, antígeno T de SV40, ou E1A adenoviral também eleva os níveis de CDKN2A (XIONG; ZHANG; BEACH, 1993; SERRANO; HANNON; BEACH, 1993; HARA *et al.*, 1996; PARRY *et al.* 1995; TAM; SHAY; PAGANO, 1994; LI *et al.*, 1994; XIONG *et al.*, 1996; KHLEIF *et al.*, 1996). Estresse oxidativo pode causar o aumento de CDKN2A através da elevação na expressão de p38, um membro da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (IWASA; HAN; ISHIKAWA, 2003).

Cerca de 50% dos tumores apresenta inativação de CDKN2A, variando de 25 a 70% de acordo com a origem histológica (GONZALEZ; SERRANO, 2006). Portanto, a ação

antitumoral de CDKN2A pode ser vantajosa em contexto clínico, havendo tentativas de se restaurar sua expressão em linhagens tumorais *in vitro* e *in vivo* (ADACHI *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2000; CHINTALA *et al.*, 1997). Os resultados obtidos envolvem diminuição da proliferação celular e ciclo barrado em G₁ com apresentação de fenótipo senescente. Linhagens responsivas a CDKN2A transgênico são aquelas que preservam pRb funcional, enquanto linhagens que falham na resposta de CDKN2A perderam pRb (RUAS; PETERS, 1998).

O *locus* gênico de CDKN2A é um ponto de convergência para alterações genéticas e epigenéticas oncogênicas. Isso se deve à sua localização cromossomal, 9p21, também abrigar outros dois supressores de tumor: p15^{INK4b} (que possui seu próprio gene, *CDKN1B*), e p14^{ARF} (ARF - *Alternative Reading Frame*).

CDKN2A e p14^{ARF} não só compartilham o mesmo gene, *CDKN2A*, como também dois éxons. CDKN2A utiliza os éxons 1 α -2-3, enquanto p14^{ARF} utiliza os éxons 1 β -2-3. Cada transcrito possui promotor próprio e p14^{ARF} é traduzido em outra fase de leitura, tornando sua sequência de aminoácidos completamente distinta de CDKN2A. p14^{ARF} atua impedindo a degradação de p53 por seu inibidor, MDM2 (ver 1.3.2). Assim, deleção homozigótica, mutação ou silenciamento por metilação do gene *CDKN2A*, ou ainda translocação da região 9p21, atinge ambas as vias CDKN2A/pRb e p53, afetando as principais barreiras antitumorais da célula (GONZALEZ; SERRANO, 2006; LI *et al.*, 2011; KO *et al.*, 2016).

1.3 Proteína Supressora de Tumor p53

O fator de transcrição p53 foi descoberto em 1979 por diversos grupos como uma proteína de 53 kDa complexada com o antígeno T-grande (*large-T antigen*) do vírus SV40 (HARRIS, 1996). Inicialmente isolado de tumores murinos e humanos, o gene apresentou função oncogênica, cooperando com a proteína RAS na transformação de fibroblastos murinos. No final da década de 80, ficou claro que essa propriedade pertencia apenas a cópias mutantes do gene, enquanto a proteína selvagem possuía função supressora de tumor (HARRIS, 1996; HAINAUT; HOLLSTEIN, 1999). Na década de 90, alterações constitutivas em p53 foram detectadas em pacientes com síndrome de Li-Fraumeni, doença autossômica rara caracterizada pelo desenvolvimento precoce de diversos tipos de câncer. Paralelamente, Donehower e colegas (1992) demonstraram que camundongos com deleção homozigótica e

hemizigótica de p53 apresentavam desenvolvimento normal, mas eram propensos ao aparecimento prematuro de múltiplos cânceres. Essas observações levaram à conclusão de que p53 seria um supressor de tumor de importância central (HAINAUT; HOLLSTEIN, 1999). Para mais informações sobre a história de p53, ver Levine e Oren, 2009.

1.3.1 Estrutura de p53

O gene *TP53*, localizado no cromossomo 17p13.1, codifica o fator de transcrição p53, de 393 aminoácidos e alvo mais frequente de mutações no câncer. Cerca de 50% dos tumores humanos apresentando alterações no gene, variando de 10% (hematopoiéticos) a 70% (ovarianos, colorretais e de cabeça e pescoço) (BROSH; ROTTER, 2009; OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010). O estado funcional de p53 é como homotetrâmero, sendo que cada monômero apresenta um domínio de ativação N-terminal (Met1-Asp42), um domínio rico em prolina com múltiplas cópias do motivo PXXP (Asp61-Ser94), um domínio central de ligação ao DNA (Thr102-Lys292) e uma região C-terminal (Pro301-Asp393) contendo um domínio de tetramerização (Asp324-Ala 355) (figura 3) (SAHA; KAR; SA, 2015).

Figura 3 Domínios da proteína p53 (adaptado de SAHA; KAR; SA, 2015).

O domínio N-terminal é necessário para interação entre p53, seus ativadores e seus inibidores, e é crucial para interação com MDM2 e MDMX, proteínas repressoras de alta importância. A estrutura secundária desse domínio é transientemente estável, ou seja, pode aumentar ou diminuir de estabilidade dependendo de modificações pós-traducionais (MPTs). Segundo

estudos experimentais e de simulação *in silico*, a pequena região Phe19-Leu26 é responsável pela ancoragem de MDM2 (SAHA; KAR; SA, 2015), inibidor que impede a função de transcrição e expõe p53 para ubiquitinação (item 1.3.2).

O domínio de ligação ao DNA liga p53 à fenda maior da dupla-fita por um mecanismo cuja estabilidade depende de Zn^{2+} (JOERGER; ALLEN; FERSHT, 2004). De acordo com a base de dados da Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC - <http://www.p53.iarc.fr/>), mais de 95% das mutações em p53 ocorrem nesse domínio (OLIVIER *et al.*, 2002). Estudos computacionais resolveram a estrutura conformacional do domínio de ligação ao DNA, levando à determinação de seu mecanismo de estabilização de p53 (LU; TAN; LUO, 2007; KITAYNER *et al.*, 2006; MA; LEVINE, 2007; PAN; NUSSINOV, 2007; LUBIN; BUTLER; LOH, 2010; NAGAICH *et al.*, 1999). O domínio se conecta à região C-terminal, fazendo com que a tetramerização de p53 dependa de sua ligação inicial ao DNA.

p53 está sujeito a uma diversa gama de MPTs que envolvem a adição covalente de grupos funcionais, tais como fosforilação, acetilação, ubiquitinação, sumoilação e *neddilação* (transferência covalente de Nedd8, similar a ubiquitina). Fosforilação de p53 aumenta sua estabilidade e capacidade de ligação ao DNA (ASHCROFT; KUBBUTAT; VOUSDEN, 1999; HAINAUT; HOLLSTEIN, 1999). Em resposta a dano genômico, p53 pode sofrer fosforilação/defosforilação em 17 sítios, incluindo 9 no domínio N-terminal, 3 no domínio de ligação ao DNA e 2 na região C-terminal (CHEHAB *et al.*, 1999). Alguns destes sítios, quando fosforilados, aumentam a interação de p53 com DNA; outros podem diminuir a interação p53-MDM2; outros sinalizam para apoptose; e fosforilação de Ser392 estabiliza a formação de tetrâmeros. Além disso, defosforilação em alguns sítios pode estabilizar a molécula (SAHA; KAR; SA, 2015).

Acetilação aumenta a meia-vida de p53, além de ativar sua função transcricional e poder iniciar apoptose (BARLEV *et al.*, 2001; KRUSE; GU, 2009). Acetilação de p53 resulta em atividade transcricional independentemente do estado de fosforilação, sendo que um dos sítios de acetilação é exposto apenas após ligação ao DNA (ČEŠKOVÁ *et al.*, 2006; LUO *et al.*, 2004). Acetilação em Lys120 inicia apoptose independente de transcrição (SYKES *et al.*, 2009). Por meio de simulação, Fan e colegas (2014) demonstraram que, em resposta a radiação-gama, p53 oscila seu estado de fosforilação por 6 h e então a forma acetilada se acumula, o que aponta para respostas distintas dependendo do padrão de MPT de p53 na

célula. Desacetilação funciona como um rápido mecanismo de inativação de p53 após a resposta ao estresse terminar e a célula retornar à homeostase (KRUSE; GU, 2009).

Conjugação covalente de ubiquitina leva a proteína-alvo à degradação no proteossomo. MDM2 nesse contexto funciona como uma E3-ligase e direciona a adição de ubiquitina em resíduos de lisina na porção C-terminal de p53 (XU, 2003; item 1.3.2).

Mutações em p53 consistem principalmente em substituições de aminoácidos individuais (ROTTER, 1983). Cho *et al.* resolveu a estrutura cristalográfica de p53 ligado ao DNA em 1994, o que forneceu o arcabouço básico para estudo dos efeitos das mutações pontuais comumente envolvidas com o câncer (CHO *et al.*, 1994). Foi observado que há uma alta ocorrência de mutações em apenas alguns aminoácidos específicos, que são comumente chamadas de mutações “*hot spot*” (HARRIS; HOLLSTEIN, 1993; MA; LEVINE, 2007; PETITJEAN *et al.*, 2007). Tais mutações encaixam-se em duas categorias: mutações de contato e mutações de estrutura (JOERGER; ANG; FERSHT, 2006).

As mais comuns no câncer são Arg175His, Gly245Ser, Arg248Trp, Arg249Ser, Arg273His e Arg282Trp, todas localizadas no domínio de ligação ao DNA (HAINAUT; HOLLSTEIN, 1999), caracterizando-se como mutações de contato. Mutações estruturais, como Arg175His, Arg249Ser, Arg282Trp e Arg110Pro, afetam a estabilidade termodinâmica da proteína em vários níveis (KOULGI *et al.*, 2013; RAUF *et al.*, 2010), podendo alterar o dobramento molecular, causar desnaturação, desdobramento e dificuldade no endereçamento nuclear devida a mudança conformacional.

Pela necessidade de p53 formar um homotetrâmero funcional para transcrever seus genes-alvo, mutações hemizigóticas são capazes de anular sua atividade transcricional pela formação de heterotetrâmeros não-funcionais num fenômeno de dominação-negativa (BROSH; ROTTER, 2009). Além disso, algumas mutações de p53 resultam em ganho de função, que não só levam a perda das funções supressoras de tumor, como também a ganho de propriedades oncogênicas (HUANG *et al.*, 2014; WALERYCH *et al.*, 2012; XU *et al.* 2011).

A plasticidade de p53 está ligada à sua interação com diferentes proteínas e peptídeos, como 53BP1 e proteínas da família ASPP (KRUSE; GU, 2009). Logo, pequenas moléculas e peptídeos podem ter papel na reativação de p53, o que tem sido uma frente importante no desenho de novas drogas (BROWN *et al.*, 2011). Tal reativação de p53, em paralelo com a reintrodução da molécula selvagem, se tornou uma área de grande atenção na biologia de p53 (LEVINE, 1997). As estratégias de reativação consistem em: desfazer a interação p53-

MDM2, como no caso da droga Nutlin-3a (JOERGER; FERSHT, 2010) e do metabólito fúngico clorofuscina (DUNCAN *et al.*, 2001), entre outros (SAHA; KAR; SA, 2015); reativação das mutações de p53, como com as moléculas PRIMA-1 e PRIMA-1^{Met} (BYKOV *et al.*, 2002; ZACHE *et al.*, 2008); ou reativação explorando outras interações proteína-proteína (KRAVCHENKO *et al.*, 2008)

1.3.2 Regulação de p53

p53 ganhou o apelido de “Guardião do Genoma” (LANE, 1992) pelo seu papel central na coordenação das respostas celulares a um amplo espectro de fatores estressores. A proteína funciona como um ponto de encontro que organiza e emite a resposta adequada a cada estímulo, entre elas apoptose, parada do ciclo celular, senescência, reparo de DNA, metabolismo celular e autofagia. A transativação de genes-alvo controlada por p53 é uma característica essencial de cada via de resposta, apesar de alguns efeitos de p53 serem independentes de transcrição (MARCHENKO; MOLL, 2007; VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000; VOUSDEN; LANE, 2007). Como mencionado previamente, p53 é regulado por uma gama de MPTs tanto durante homeostase quanto sob estresse. No entanto, essas modificações são apenas uma parte da regulação a que p53 está submetido.

O controle de p53 se dá primariamente por sua degradação proteossomal mediada por ubiquitina (BROOKS; GU, 2006; MICHAEL; OREN, 2003). Três estudos independentes identificaram a proteína MDM2 como a principal ubiquitina-ligase E3 endógena com alta afinidade a p53 (HAUPT *et al.*, 1997; HONDA; TANAKA; YASUDA, 1997; KUBBUTAT; JONES; VOUSDEN, 1997). MDM2 ubiquitina p53 preferencialmente em seis resíduos de lisina do domínio C-terminal (LOHRUM *et al.*, 2001), mas que demonstrou-se não serem essenciais visto que há ubiquitinação por MDM2 também em outros resíduos (CHAN, 2006). Em sentido contrário, a desubiquitinação de p53 também é regulada, sendo seu maior atuante o complexo proteico HAUSP (LI; CHEN, 2002).

Dessa maneira, a regulação negativa de MDM2 pode causar estabilização e aumento de p53 durante respostas ao estresse. Um regulador proeminente de MDM2 é o supressor de tumor p14^{ARF} (LOWE; SHERR, 2003). Os níveis normais baixos de p14^{ARF} são dramaticamente aumentados sob estresse oncogênico, o que suprime o crescimento anormal de células por causar regulação de MDM2 e consequente parada do ciclo ou apoptose induzidos por p53

(SHERR, 2006). p14^{ARF}, uma proteína nucleolar, age de duas maneiras: sequestrando MDM2 no nucléolo (WEBER *et al.*, 1999), e inibindo diretamente sua atividade de ubiquitina-ligase (LLANOS *et al.*, 2001; HONDA; YASUDA, 1999). A atividade de MDM2 também é regulada por fosforilação e acetilação. Diversos sítios de fosforilação foram descritos, e, dependendo do sítio ou da quinase atuante, essas MPTs podem inibir ou ativar MDM2 (KRUSE; GU, 2009; MEULMEESTER *et al.*, 2005b).

Curiosamente, a própria expressão de MDM2 é controlada por promotor responsivo a p53. Análise por imunoprecipitação de cromatina mostra que p53 está presente nos promotores dos genes *CDKN1A* (expressor de p21^{Cip1}) e *MDM2* em células *wild-type* na ausência de estresse (KAESER; IGGO, 2002; SZAK; MAYS; PIETENPOL, 2001), o que corrobora a ideia de que p53 possui expressão constante na célula, chegando a ativar genes em baixa intensidade, como p21^{Cip1} (SHERR; ROBERTS, 1995) e MDM2. No entanto, ao expressar MDM2, p53 sinaliza para sua própria regulação, gerando um ciclo de retroalimentação negativa que impede que níveis internos de p53 subam demais em contexto fisiológico, o que seria danoso à célula (MOMAND; ZAMBETTI, 1997; PIETTE; NEEL; MARÉCHAL, 1997). Assim, os níveis de p53 são mantidos por um *steady-state* de repressão em que qualquer estímulo que almeje sua ativação deve antes quebrar o ciclo de regulação negativa p53-MDM2 (KRUSE; GU, 2009).

Outra proteína notória na regulação de MDM2 e de p53 é MDMX (ou MDM4 – MARINE; JOCHEMSEN, 2005). MDMX estabiliza ambos MDM2 e p53, mas pode promover a atividade E3-ligase de MDM2 (LINARES *et al.*, 2003; POYUROVSKY *et al.*, 2007; ULDRIJAN; PANNEKOEK; VOUSDEN, 2007). Apesar da homologia com MDM2, MDMX não possui atividade ubiquitina-ligase própria, inibindo p53 por impedimento de sua atividade transcricional (MARINE; JOCHEMSEN, 2005), o que lhe confere a propriedade de inibir p53 sem causar sua degradação. Essa característica pode ter papel na decisão de uma célula entrar em apoptose ou apenas parar do ciclo celular (BARBOZA *et al.*, 2008).

Uma maneira alternativa de regular a atividade de p53 é sinalizar sua exportação do núcleo. Isso garante que sua atividade transcricional seja coibida, e permite que p53 realize funções no citoplasma. Monoubiquitinação por MDM2 (LI, 2003; LOHRUM *et al.*, 2001; MARCHENKO; MOLL, 2007) ou por MSL2 (KRUSE; GU, 2009) em sítios específicos promovem esse sinal, transportando p53 ao citoplasma, onde ele pode interagir com proteínas mitocondriais na via apoptótica, ou sinalizar autofagia (CHIPUK, 2004; MARCHENKO; MOLL, 2007; MIHARA *et al.*, 2003; TASDEMIR *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2006).

1.3.3 Vias Ativadoras de p53

É possível dividir as vias de ativação de p53 em três categorias: vias basais ou de homeostase, vias ativadas com estresse celular moderado, e vias ativadas com estresse celular severo ou oncogênico. Em níveis basais, mesmo sem estresse celular, p53 participa de diversos processos fisiológicos (JUNTILA; EVAN, 2009). Além de manter baixos, mas constantes, níveis de p21^{Cip1} (SHERR; ROBERTS, 1995) e de induzir a expressão de seu próprio repressor, MDM2 (item 1.3.2), p53 regula vias do metabolismo celular (KANFI *et al.*, 2008) e respiração mitocondrial (MATOBA, 2006), autofagia (TASDEMIR *et al.*, 2008), adesão celular (GODAR *et al.*, 2008), biogênese ribossomal (GOLOMB; VOLAREVIC; OREN, 2014), manutenção de células-tronco (GATZA *et al.*, 2007), fertilidade (HU *et al.*, 2007) e desenvolvimento embrionário (DANILOVA; SAKAMOTO; LIN, 2008).

Estímulos estressores moderados ativam p53 por MPTs e regulam a atividade de MDM2. Esses estímulos podem incluir perda de ancoragem celular (GOLUBOVSKAYA; CANCE, 2007), falta de nutrientes (HUMPTON; VOUSDEN, 2016), hipóxia (AMELIO; MELINO, 2015; HUMPTON; VOUSDEN, 2016), estresse oxidativo (BUDANOV, 2014) e dano moderado ao DNA (MEEK, 2009).

Escassez de nutrientes e privação de oxigênio, ou excesso de ambos, podem impactar negativamente o organismo (LIU; CHEN; ST. CLAIR, 2008; CIRCU; AW, 2010; WELLEN; THOMPSON, 2010). A célula detecta perturbações nessas condições por sensores intracelulares, que rapidamente as comunicam à via p53, causando sua estabilização (HORN; VOUSDEN, 2007; HUMPTON; VOUSDEN, 2016; VOUSDEN; RYAN, 2009). Com ativação, p53 age como fator de transcrição e interagente citoplasmático promovendo, dependendo da natureza do estresse, geração de energia por respiração anaeróbica no caso de hipóxia, ou, no caso de escassez de nutrientes, manutenção de níveis de energia pelo início da autofagia e sequestro do ciclo celular pela expressão de p21^{Cip1} até a restauração do alimento (HUMPTON; VOUSDEN, 2016). Se as condições inóspitas perdurarem, p53 ativa as vias canônicas de morte celular por apoptose (POLYAK *et al.*, 1997; item 1.5).

Excesso de espécies reativas de oxigênio, EROs, causa dano oxidativo ao DNA, o que aumenta a mutagênese e a instabilidade cromossomal. Além disso, EROs podem reagir com outras macromoléculas, gerando estresse oxidativo. Disfunção mitocondrial pode gerar aumento descontrolado na produção de EROs como superóxido (O_2^-), H_2O_2 , ou causar a

vazão de elétrons do espaço intermembranar (BALABAN; NEMOTO; FINKEL, 2005; FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Após dano genômico causado por EROs, a célula responde ativando p53, que age como fator de transcrição de genes antioxidantes, como superóxido dismutase, glutathione peroxidase 1, sestrinas, TIGAR, glutaminase-2, entre outros, além de ativar a maquinaria de reparo de DNA (BUDANOV, 2014). Caso o estresse oxidativo e o dano genômico sejam extensos, p53 altera o curso de sua resposta promovendo indução de senescência ou apoptose (LIU; XU, 2011).

Dano ao DNA abrange um espectro que vai de moderado a severo. Dependendo do tipo e da extensão do dano, p53 é ativado e pode responder propiciando o reparo de DNA, parada do ciclo, autofagia, senescência ou desencadeando apoptose (RILEY *et al.*, 2008). Em mamíferos, a célula detecta danos em três pontos ao longo do ciclo celular, conhecidos como *checkpoints*: na transição G₁/S, durante a duplicação genômica em S, e na transição G₂/M (SANCAR *et al.*, 2004).

As vias de p53 são extremamente sensíveis a um número bem pequeno de quebras na dupla-fita ou de lacunas em simples-fitas de DNA (HUANG; CLARKIN; WAHL, 1996). As vias de indução de p53 levam à sua ativação e estabilização por MPTs (KUMARI; KOHLI; DAS, 2014), mas o evento crucial é a inibição de sua regulação por MDM2 e MDMX (MEEK, 2009).

A resposta ao dano ao DNA é coordenada por dois sinalizadores, ATM e ATR, que mediam a rápida destruição de MDM2 e MDMX (MEULMEESTER *et al.*, 2005a, 2005b; STOMMEL; WAHL, 2004). ATM participa da detecção de quebras na dupla-fita, enquanto ATR participa da resposta a outros tipos de dano, como lacunas em simples-fitas, estresse de replicação e *crosslinking* de DNA.

Ambas as vias induzem uma gama de MPTs em p53, o que leva a respostas proporcionais à natureza do dano e à intensidade do estresse. Cada código de fosforilação de p53 é interpretado de maneira diferente, podendo levar a um ou mais efeitos (ESPINOSA, 2008; MURRAY-ZMIJEWSKI; SLEE; LU, 2008). O reparo de DNA não ocorre com o ciclo em andamento visando evitar a propagação de erros, e o mecanismo de freio se dá por p53 ao expressar o CDKI p21^{Cip1}, que barra o ciclo em um dos *checkpoints* (HAUPT; HAUPT 2017).

Por fim, os estímulos estressores ativadores de p53 podem ser de natureza severa. Tais estímulos incluem dano irreparável e extenso ao DNA e a superexpressão de oncogenes, e

podem levar a célula a tomar as decisões drásticas de entrar em senescência ou disparar o programa de morte por apoptose. O escape desses destinos caracteriza a imortalidade da célula, e é considerado um passo crucial na transformação oncogênica. Os mecanismos da senescência, incluindo senescência induzida por oncogenes, são revistos no item 1.4. Os mecanismos da indução de apoptose são revistos no item 1.5.

1.4 Senescência Celular

Senescência celular é um processo complexo e heterogêneo que leva a célula à parada irreversível do ciclo e, assim, limita seu potencial proliferativo. Senescência é diferente de quiescência; células quiescentes conseguem reiniciar o ciclo com os estímulos adequados (CAMPISI; DI FAGAGNA, 2007), enquanto as senescentes não respondem a estímulos mitóticos (SERRANO; BLASCO, 2001; COLLADO; BLASCO; SERRANO, 2007). Além disso, células senescentes são extremamente estáveis e resistentes à apoptose (CAMPISI; DI FAGAGNA, 2007; MARCOTTE; LACELLE; WANG, 2004; HAMPEL *et al.*, 2005). Estudo em células de osteosarcoma com expressão de CDKN2A, indutor de senescência (item 1.2), condicionada a tetraciclina indica que o processo de senescência possui uma fase inicial em que pode ser revertido se a expressão do gene for descontinuada, mas que se torna autônomo e irreversível após expressão contínua de CDKN2A por determinado período, mesmo que posteriormente esta seja cortada (DAI; ENDERS, 2000).

Os principais mecanismos moleculares de estabelecimento e manutenção da senescência são mediados pelas vias p53-p21^{Cip1} e CDKN2A-pRb (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005). Senescência induzida por p27^{Kip1} e independente dessas vias também foi reportada (COLLADO *et al.*, 2000). p53 pode ser ativado pelas vias que o estabilizam por fosforilação e pela degradação de seu repressor, MDM2 (KHAN *et al.*, 2004, item 1.3.3). Uma vez estabilizado, p53 ativa p21^{Cip1}, inibidor do ciclo celular, que causa sequestro em G₁ por ativar pRb e desencadeia senescência (BROWN; WEI; SEDIVY, 1997; COSME-BLANCO *et al.*, 2007; VAN NGUYEN *et al.*, 2007; JUAN A BARBOZA *et al.*, 2006). Além da via p53-p21^{Cip1}, senescência pode ser ativada por CDKN2A, inibidor de ciclina D:CDK4/6, que consequentemente leva à ativação de pRb e parada do ciclo em G₁. Células pRb^{-/-} são resistentes à senescência (CHICAS *et al.*, 2010).

Senescência é ativada em resposta a uma variedade de estímulos. Hayflick e colegas, em 1961, descreveram senescência replicativa como um processo irreversível de cessão do crescimento alcançado por fibroblastos humanos após passagens seriadas em cultura. Posteriormente foi descoberto que isso se deve ao encurtamento dos telômeros, porções não-codificantes de DNA que flanqueiam os cromossomos e evitam a degradação do DNA periférico durante a replicação (HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990). Acredita-se que esse mecanismo, que também ocorre *in vivo*, esteja por trás do envelhecimento de organismos (CAMPISI; DI FAGAGNA, 2007; CAMPISI, 2005; RESSLER *et al.*, 2006; HERBIG *et al.*, 2006; JEYAPALAN *et al.*, 2007). Estresses genotóxico (dano direto ao DNA), oxidativo e oncogênico também podem causar senescência, nesses casos chamada de prematura (BEN-PORATH; WEINBERG, 2005; SIKORA *et al.*, 2011).

Estresse oxidativo se dá pelo acúmulo de EROs, que causam danos ao DNA e a proteínas (CHEN *et al.*, 1998; SITTE *et al.*, 2000; item 1.3.3). Indução de senescência foi atrasada significativamente em fibroblastos humanos cultivados com baixo teor de oxigênio (3%) quando comparados ao cultivo padrão *in vitro* a 20% de oxigênio (CHEN *et al.*, 1995). Além disso, tratamento de diversas linhagens com concentrações sub-letais de H₂O₂ provou-se um indutor de senescência celular (CHEN *et al.*, 1998; CHEN; AMES, 1994; FRIPPIAT *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2011; CHEN, 2000; CHEN *et al.*, 2000; ARAVINTHAN *et al.*, 2014). Estresse oxidativo induz senescência pelas vias clássicas p53-p21^{Cip1} e pRb-CDKN2A (CHEN *et al.*, 1995), mas também pela ativação de p38, que exerce seu efeito pela via pRb-CDKN2A e é p53-independente (IWASA; HAN; ISHIKAWA, 2003).

Além de EROs, dano ao DNA por radiação, agentes químicos genotóxicos ou outras fontes também induz senescência (CHEN *et al.*, 1995; BARTKOVA *et al.*, 2006; DI MICCO *et al.*, 2006). Inclusive, dano à porção telomérica do DNA pode desencadear senescência na ausência de seu encurtamento (HEWITT *et al.*, 2012). Esse tipo de estresse estabiliza p53 pelas vias de resposta ao dano ao DNA, e ativa pRb através de CDKN2A. Após irradiação, enquanto os níveis de p53 e p21^{Cip1} aumentam rapidamente formando um pico, CDKN2A tem seu aumento de forma gradual (ROBLES; ADAMI, 1998; SHAPIRO *et al.*, 1998). Essas observações sugerem que o processo senescente pode ser revertido se o dano for corrigido rapidamente, mas levam à senescência irreversível caso contrário (DAI; ENDERS, 2000).

Superexpressão de oncogenes ou de seus efetores causam senescência prematura *in vitro* (SERRANO *et al.*, 1997; TAKAOKA *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 1998; TU; AIRD; ZHANG, 2012) e *in vivo* (MICHALOGLOU *et al.*, 2005; BRAIG *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005;

COLLADO *et al.* 2005). Tais achados sustentam a ideia de que a senescência celular possui uma função supressora de tumor. Estudos *in vivo* indicam aumento de níveis de CDKN2A em senescência induzida por oncogenes (MALDONADO *et al.* 2004; BENNETT 2003, ver 1.2), e indução de p53 e p21^{Cip1} foi demonstrada em fibroblastos humanos e células epiteliais mamárias (BARTKOVA *et al.*, 2006; DI MICCO *et al.*, 2006; SERRANO *et al.*, 1997). A indução de p14^{ARF} por oncogenes ativos é considerada a via clássica de ativação de p53 em resposta à proliferação sustentada, e funciona independentemente da resposta de dano ao DNA (MEEK, 2009). No entanto, ao causarem proliferação aberrante, oncogenes também levam a estresse de replicação pela indução de forquilhas de replicação malformadas ou travadas (BARTKOVA *et al.*, 2006; DI MICCO *et al.*, 2006), o que pode ativar p53 pelas vias de reparo de DNA (BARTKOVA *et al.*, 2005; GORGOULIS *et al.*, 2005; LINDSTRÖM; WIMAN, 2003).

Células senescentes sofrem grandes alterações morfológicas e bioquímicas. Características prontamente visíveis ao microscópio óptico são o aumento em tamanho e o achatamento acompanhados de um núcleo alargado (NARITA, 2007; MEHTA *et al.* 2007, este trabalho). O núcleo senescente também apresenta um nucléolo alargado e diversos focos visíveis com coloração DAPI (NARITA *et al.* 2003). Tais focos podem ser de dois tipos: focos heterocromáticos associados a senescência (FHAS) (NARITA *et al.* 2003, 2006) ou focos de dano ao DNA associados a senescência (FDS) (DI FAGAGNA *et al.* 2003; WANG *et al.* 2009). FHAS são estruturas heterocromáticas que incluem regiões de transcrição inativa do genoma enovelados em cromatina densa. Esses focos agrupam proteínas específicas, incluindo histonas com modificações pós-traducionais, e são necessários para a supressão de genes de proliferação como E2F (NARITA *et al.* 2003, 2006). FDS contêm proteínas associadas à resposta de dano ao DNA e se manifestam quando há quebras na fita de DNA ou forquilhas de replicação aberrantes associadas a oncogenes (DI FAGAGNA *et al.* 2003; TAKAI; SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2003).

Células senescentes, mas não pré-senescentes ou diferenciadas, expressam β -galactosidase associada a senescência (SA- β -GAL) detectável em pH 6,0. SA- β -GAL pode ser detectada em células isoladas por coloração histoquímica utilizando o substrato artificial X-Gal, que forma um precipitado azul ao ser clivado por SA- β -GAL (DIMRI *et al.*, 1995).

Outras características do processo senescente são: disfunção mitocondrial e produção aumentada de EROs, com acúmulo de produtos de oxidação (PASSOS; SARETZKI; VON ZGLINICKI, 2007; PASSOS; VON ZGLINICKI; KIRKWOOD, 2007); expressão de

microRNAs (miRNAs), capazes de controlar diversos processos celulares pelo silenciamento de mRNAs (SMITH-VIKOS; SLACK, 2012; LI *et al.* 2009; SCHRAML; GRILLARI, 2012).

Autofagia, um processo no qual a célula digere componentes internos para gerar energia e precursores metabólicos sob condições de estresse, possui relação próxima com a senescência (HOARE; YOUNG; NARITA, 2011; NAM *et al.*, 2013). No entanto, ambas as vias são independentes e a supressão de autofagia não impede o curso do processo de senescência (GOEHE *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2009). A via catabólica da autofagia é espacialmente e temporalmente ligada à via anabólica associada à proteína mTOR, permitindo que a degradação proteica do conteúdo intracelular alimente matéria-prima diretamente à produção do fenótipo secretório da senescência (NARITA *et al.* 2011).

O fenótipo secretório associado a senescência (em inglês, SASP) (COPPÉ *et al.*, 2008; DAVALOS *et al.*, 2010; KUILMAN; PEEPER, 2009) consiste em uma variedade de fatores secretados por células senescentes que influenciam o microambiente ao redor. Os fatores podem desencadear e manter o processo senescente de maneira autócrina e parácrina (ARAVINTHAN, 2015). SASP também pode promover tumorigênese em células vizinhas, especialmente pré-malignas, pela secreção de metaloproteinases de matriz, ativação da via Notch em células-tronco e progenitoras, e promover vascularização tumoral (KRTOLICA *et al.* 2001; PARRINELLO 2005; SANSONE *et al.* 2007; COPPÉ *et al.* 2006; ARAVINTHAN 2015). Por fim, células senescentes podem secretar fatores pró-inflamatórios como interleucinas, quimiocinas e outros (COPPÉ *et al.*, 2010). Tal efeito pode aumentar a eliminação de células tumorais pela resposta imunológica inata (XUE *et al.*, 2007) e de células senescentes por resposta imune adaptativa, processo também conhecido como “vigilância senescente” (KANG *et al.*, 2011; KRIZHANOVSKY *et al.*, 2008).

Um dos papéis fundamentais da senescência celular é a supressão de tumores, o que é alcançado pela parada do crescimento celular por sequestro em G₁ em células que apresentam certo nível de instabilidade ou degradação genômica, ou desregulação nas vias proliferativas. As vias indutoras de senescência dependem de p53 e CDKN2A, que são os genes com maior inativação em tumores humanos (ROCCO; SIDRANSKY, 2001; SHERR, 2004). Reintrodução desses genes de maneira a induzir senescência, portanto, se trata de uma potente arma na luta contra o câncer. No entanto, senescência também está implicada na tumorigênese. SASP pode aumentar a proliferação de células pré-malignas e causar vascularização tumoral; células senescentes produzem EROs, que podem causar dano genômico; e senescência não é um processo perfeito, havendo indícios de células que ou

escapam do sequestro em G₁, ou nunca entram no processo em primeiro lugar (SAGE *et al.* 2003; revisado por McDuff, 2011). Assim, senescência celular é uma faca de dois gumes: pode agir benéficamente no início da oncogênese, mas posteriormente pode apresentar ação detrimental.

1.5 Apoptose

Apoptose é um tipo de morte celular programada caracterizada pelo encolhimento celular, formação de bolhas na membrana plasmática, fragmentação celular em corpos apoptóticos e condensação da cromatina (picnose) (KERR; WYLLIE; CURRIE 1972). Molecularmente, pode ser definida como morte celular pela ativação de caspases (cisteína-aspartato-proteases) (GALLUZZI *et al.*, 2012). Duas vias de sinalização ativam morte apoptótica: a via mitocondrial (intrínseca) e a via por receptores extracelulares (via extrínseca) (GREEN; LLAMBI, 2015).

A via extrínseca envolve clássica interação ligante-receptor membranar. Por exemplo, linfócitos citotóxicos podem matar células infectadas ou transformadas pela expressão de ligantes de receptores de morte (*Death Receptors* – DRs). Esses ligantes induzem apoptose nas células-alvo contanto que essas expressem DRs em suas membranas. Esse tipo de interação é crítico para o sistema imune e sua homeostase.

Em contrapartida, a via apoptótica mitocondrial é iniciada de maneira autônoma pela célula. Estímulos estressores muito fortes, como dano irreparável ao DNA e estresse do retículo endoplasmático ativamente desencadeiam apoptose. Além disso, a falta de sinais de crescimento por citocinas, fatores neurotróficos ou outros podem levar à morte celular em tecidos específicos (BUSS; SUN; OPPENHEIM, 2006). Um exemplo intrigante desse mecanismo é a morte por *anoikis* (do grego: “sem casa”), desencadeada quando uma célula epitelial ou endotelial se desprende da matriz extracelular e a falta de sinais pró-sobrevivência dos ligantes a integrinas leva à apoptose (GREEN; LLAMBI, 2015). Por fim, apoptose pode ser induzida por oncogenes como uma salvaguarda contra o desenvolvimento do câncer. Esse processo é controlado em parte pela via dependente de p53, que é ativada em resposta a sinais mitogênicos aberrantes resultantes da superexpressão ou mutação de oncogenes (SEVER; BRUGGE, 2015).

1.5.1 Ativação de Caspases Executoras 3, 6 e 7

Ambas as vias extrínseca e intrínseca culminam na ativação de caspases executoras e na clivagem de proteínas intracelulares, o que leva a mudanças morfológicas e bioquímicas e ao desmanche da célula. Caspases executoras (caspase-3, caspase-6 e caspase-7), efetivamente responsáveis pela hidrólise dos substratos, são produzidas na forma de homodímeros inativos que não possuem domínios de clivagem (figura 4), sendo que cada monômero possui uma subunidade maior e uma menor, ambas conectadas por uma alça. A ativação da enzima se dá pela proteólise dessa alça (SALVESEN; RIEDL, 2008), o que leva o homodímero a se tornar um heterotetrâmero possuidor de dois sítios ativos. A clivagem de caspase-6 é mediada por caspase-3 e caspase-7 ativas (SLEE *et al.*, 1999), sendo que a ativação destas é catalisada pelas caspases iniciadoras 8 (via extrínseca) e 9 (via intrínseca).

Após ativadas, as caspases executoras podem processar ao menos 1000 proteínas diferentes (CRAWFORD; WELLS, 2011). A clivagem desses substratos pode levar a ganho ou perda de função, e eventualmente leva às mudanças observadas na apoptose. Por exemplo, clivagem da subunidade p75 do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial leva ao fim da produção de ATP (RICCI *et al.*, 2004).

Ao contrário das caspases executoras, caspases iniciadoras (caspase-8 ou caspase-9) existem na forma de monômeros nas células e não são ativadas por clivagem. Cada monômero é composto por uma subunidade maior e uma menor, assim como as caspases executoras, mas, ao contrário destas, apresentam um pró-domínio N-terminal chamado CARD ou DED (figura 4). Dependendo da via, plataformas ativadoras recrutam as caspases iniciadoras pelo pró-domínio CARD ou DED, forçando-as a interagirem, o que causa mudanças conformacionais que expõem seus sítios de clivagem. Em alguns casos, autoclivagem ocorre para estabilizar a enzima madura (OBERST *et al.*, 2010; POP *et al.*, 2007).

As vias intrínseca e extrínseca culminam na ativação de uma das caspases iniciadoras. A via intrínseca utiliza caspase-9, enquanto a extrínseca utiliza caspase-8. Um complexo proteico chamado inflamassomo, formado em resposta a agentes infecciosos ou moléculas inflamatórias, pode ativar apoptose utilizando caspase-1 ou caspase-5 como iniciadoras (FRANCHI; MUÑOZ-PLANILLO; NÚÑEZ, 2012). Uma quarta via, ativadora de caspase-2, também pode levar à apoptose (BOUCHIER-HAYES *et al.*, 2009; NUTT *et al.*, 2005), apesar

de esta ainda permanecer um tanto obscura (GREEN; LLAMBI, 2015; KRUMSCHNABEL; MANZL; VILLUNGER, 2009).

Figura 4 Ativação de caspases iniciadoras (8 ou 9) e executoras (3 ou 7), adaptado de (GREEN; LLAMBI, 2015). Caspases iniciadoras são ativadas por proximidade, levando a autoclivagem e exposição do sítio catalítico. O mecanismo para aproximá-las depende da via apoptótica: na via intrínseca forma-se um apoptossomo que ativa caspase-9, enquanto na via extrínseca há formação de um arcabouço proteico formado por receptores de membrana e a proteína FADD que ativa caspase-8. Ambos recrutam as caspases por seus domínios N-terminais CARD ou DED. Depois da ativação, as caspases iniciadoras clivam uma alça das caspases efetoras 3 e 7, ativando-as. Estas, por sua vez, ativam caspase-6 e clivam centenas de outros substratos intracelulares, levando à morte celular.

1.5.2 Via Intrínseca da Apoptose por Ativação de Caspase-9

A via mitocondrial da apoptose, também chamada de via intrínseca, é o mecanismo mais comum de apoptose em vertebrados, sendo ativada por estímulos estressores fortes, como dano ao DNA, privação de fatores de crescimento, oncogenes, estresse no retículo endoplasmático e sinais embrionários ou do desenvolvimento. Nessa via, as caspases executoras são ativadas pela caspase iniciadora 9, que, por sua vez, é ativada por uma plataforma proteica chamada apoptossomo (figura 5) (BRATTON, 2001; BRATTON; SALVESEN, 2010). O caminho da via parte da ativação de p53, passando pela permeabilização da membrana mitocondrial externa (em inglês, MOMP), seguida da formação do apoptossomo e culminando na ativação de caspase-9.

A indução de MOMP é altamente regulada por proteínas membros da família Bcl-2. Essas compartilham uma ou mais das quatro regiões homólogas a Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 e BH4). Há três classes de proteínas da família Bcl-2: efetores pró-apoptóticos (Bak e Bax), necessários e individualmente suficientes para MOMP (WEI *et al.* 2001); proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1), que bloqueiam MOMP; e proteínas possuidoras apenas do domínio BH3 (BID, BIM, Bad, Noxa, PUMA – adiante referidas em conjunto como BH3), que ativam os efetores pró-apoptóticos e/ou neutralizam as proteínas anti-apoptóticas (CHIPUK *et al.*, 2010; GREEN; LLAMBI, 2015).

Após sua estabilização, p53 promove a transcrição de PUMA (NAKANO; VOUSDEN, 2001), Bak (GRAUPNER *et al.*, 2011), Bax (TOSHIYUKI; REED, 1995), Noxa (ODA, 2000; SHIBUE, 2003) e BID (RILEY *et al.*, 2008; SAX *et al.*, 2002) ao se ligar às regiões promotoras de seus genes. Além disso, quando endereçado ao citoplasma, p53 diretamente ativa e regula os efetores pró-apoptóticos Bak e Bax (CHIPUK, 2004; LEU *et al.*, 2004), residentes na membrana mitocondrial externa. PUMA, além de ter sua expressão ativada por p53, também o liberta da interação com a proteína anti-apoptótica Bcl-xL (CHIPUK, 2005; FOLLIS *et al.*, 2013, 2014). Juntas, essas observações revelam que, além da regulação transcricional, interações diretas com p53 disponibilizam estruturalmente as proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas para as interações que levam ao início da MOMP.

Após ativação, Bak e Bax formam grandes oligômeros na membrana mitocondrial externa formando um poro lipídico, liberando os conteúdos do espaço intermembranar mitocondrial para o citoplasma e assim concretizando a MOMP (DEWSON *et al.*, 2008, 2009; ESKES *et*

al., 2000; GOLDSTEIN *et al.*, 2000; KORSMEYER *et al.*, 2000; MUNOZ-PINEDO *et al.*, 2006). Os ativadores BID e BIM mediam a oligomerização de Bak e Bax por interações diretas (SPIERINGS *et al.* 2005; WEI *et al.* 2001; CHIPUK *et al.* 2004; CHIPUK GREEN 2008; CHIPUK *et al.* 2010; ERSTER *et al.* 2004), enquanto Bad, Noxa e PUMA bloqueiam a inibição de Bak e Bax pelas proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL (CHIPUK *et al.* 2010; CHIPUK; GREEN, 2009; HAGN *et al.* 2010; OLTERSDORF *et al.* 2005).

O anti-apoptótico Bcl-2 encontra-se localizado na membrana mitocondrial externa complexado com os pró-apoptóticos Bak e Bax, formadores do poro. A expressão de Bcl-2 é negativamente correlacionada com a expressão de p53 e há indícios de regulação por p53 a nível pós-traducional (MIYASHITA *et al.* 1994; CIMMINO *et al.* 2005; XIA *et al.* 2008; ZHU *et al.* 2010; XU *et al.* 2013; ZHU *et al.* 2012; NAKAZAWA *et al.* 2014). Tomita e colegas (2006) demonstraram que p53 interage diretamente com Bcl-2 por seu domínio de ligação ao DNA, e que essa interação é diminuída em neoplasias com p53 mutado nesse domínio. Juntas, essas informações sugerem que disfunção de p53 pode ser responsável pelo aumento de atividade de Bcl-2 de maneiras transcrição-dependentes e independentes, o que inibe a apoptose e leva à sobrevivência da célula.

Figura 5 Via intrínseca da apoptose (adaptado de Green e Llambi, 2015). Nessa via, uma série de estímulos, como dano genômico ou superexpressão de oncogenes, levam à ativação de p53. Este, por sua vez, ativa proteínas pró-apoptóticas, como Bak e Bax, enquanto inativa proteínas anti-apoptóticas. Bak e Bax se oligomerizam formando um poro na membrana externa mitocondrial, levando à sua permeabilização (MOMP) e liberação de seu conteúdo no citoplasma. Entre as proteínas vazadas está o citocromo C, que se liga a Apaf-1 formando um apoptossomo, estrutura proteica que permite a ativação por proximidade de caspase-9, iniciadora da apoptose.

Com a ativação de Bak e Bax, MOMP é alcançada e o conteúdo do espaço intramembranar é liberado no citoplasma. Esse conteúdo inclui o citocromo C (TAIT; GREEN, 2010), que se liga ao Fator Ativador de Protease Apoptótica 1 (Apaf-1) (ZOU *et al.*, 1997), formador da estrutura do apoptossomo. No centro do apoptossomo, domínios CARD de Apaf-1 se ligam aos pró-domínios CARD de caspase-9, colocando os monômeros inativos de caspase-9 em proximidade para sua ativação (YU *et al.*, 2005; YUAN; KROEMER, 2010). Caspase-9 inativa possui maior afinidade ao apoptossomo que caspase-9 processada, o que cria um ciclo de reposição de caspase-9 que é limitado somente pela sua disponibilidade no citoplasma (MALLADI *et al.*, 2009).

1.5.3 Via Extrínseca da Apoptose por Ativação de Caspase-8

Caspase-8 é ativada predominantemente pela via dos “receptores de morte”, que são um subconjunto dos receptores TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptors*) possuidores de um “domínio de morte” em sua porção intracelular (DICKENS *et al.*, 2012). Através de interações homotípicas, esses receptores iniciam a montagem de grandes complexos macromoleculares que recrutam e ativam caspase-8 para sinalização apoptótica, de maneira análoga ao apoptossomo na via intrínseca (NEWTON; DIXIT, 2012).

Ao receberem seu ligante extracelular, receptores TNFR se aglomeram e recrutam um adaptador intracelular, FADD. Essa interação expõe um domínio de FADD chamado DED. Esse complexo proteico forma uma plataforma ativadora de caspases que recruta caspase-8 por seu próprio pró-domínio DED, que interage com o domínio DED de FADD. Isso coloca os monômeros de caspase-8 em proximidade, desencadeando sua ativação (de maneira similar à caspase-9) e iniciando sua atividade catalítica. Em seguida, os monômeros ativos de caspase-8 se autoprocessam e se libertam no citoplasma (DICKENS *et al.*, 2012).

1.5.4 Vias Alternativas de Ativação de Apoptose

Caspases iniciadoras 1 e 5 são recrutadas numa estrutura chamada inflamassomo e possuem pró-domínios CARD. Inflamassomos se formam em resposta a agentes infecciosos como DNA citossólico (por exemplo, viral; HORNUNG *et al.* 2009), flagelina e outros antígenos

microbianos (FAUSTIN *et al.*, 2007; FRANCHI *et al.*, 2009; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002), e substâncias inertes capazes de induzir inflamação (como cristais de ácido úrico e asbestos) (FRANCHI; MUÑOZ-PLANILLO; NÚÑEZ, 2012). O inflamassomo induzido pela detecção de DNA citossólico é capaz de clivar e secretar interleucinas, e pode ativar caspases-3/7 para promover apoptose através de MOMP. Essa forma de apoptose é às vezes chamada de piroptose (BRENNAN; COOKSON, 2000; COOKSON; BRENNAN, 2001; FINK; COOKSON, 2006; BERGSBAKEN; COOKSON, 2007).

As funções de caspase-2 não são completamente conhecidas (GREEN; LLAMBI, 2015; KRUMSCHNABEL; MANZL; VILLUNGER, 2009). Caspase-2 é ativada em resposta a choque térmico, ruptura de microtúbulos e dano genômico (BOUCHIER-HAYES *et al.*, 2009). Também foi implicada em apoptose de oócitos (NUTT *et al.*, 2005) e neurônios (TROY *et al.*, 1997, 2000, 2001). Como caspase-8, caspase-2 é ativada por proximidade induzida seguida de mudanças conformacionais e autoclivagem (BALIGA; READ; KUMAR, 2004).

1.6 Gliomas e Glioblastoma Multiforme

Gliomas são tumores neuroepiteliais originários das células gliais do sistema nervoso central (SNC). Tumores gliais consistem em astrocitomas, oligodendrogliomas, tumores oligoastrocíticos e tumores glioneuronais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica gliomas quanto à agressividade em níveis de I a IV, abrangendo de menos agressivos (nível I) aos mais agressivos (nível IV), quando são denominados glioblastomas ou glioblastomas multiformes (GBMs) (FORST *et al.*, 2014).

A OMS também classifica os tumores no SNC quanto à sua origem histológica. Essa classificação, que dependia de análise morfológica dos tecidos tumorais (LOUIS *et al.*, 2007), em 2016 passou a incluir análises moleculares como parâmetro. Segundo a classificação de 2016, gliomas e GBMs são definidos como “Tumores Astrocíticos e Oligodendrogliais Difusos” em referência à sua origem e ao seu padrão de invasão. Dentro dessa categoria estão inclusos astrocitomas níveis II e III, oligodendrogliomas níveis II e III, e GBMs, que, por definição, são de nível IV (LOUIS *et al.*, 2016).

Tumores cerebrais malignos (níveis III e IV) correspondem a 2,4% de todas as mortes anuais por câncer nos Estados Unidos (OSTROM *et al.*, 2014) e 1% das mortes anuais por câncer no Brasil (BADKE *et al.*, 2014). Eles são diagnosticados em pacientes de todas as idades, incluindo crianças, sendo que o único fator de risco comprovado é exposição à radiação ionizante. GBMs representam 60% dos tumores cerebrais malignos, tendo uma maior incidência em homens com idade média de 64 anos. O tempo de sobrevida médio de pacientes GBM é de 14 a 16 meses, e apenas 5% dos pacientes diagnosticados sobrevivem após 5 anos (DE GROOT, 2015; OSTROM *et al.*, 2014).

Recorrência em GBM é praticamente universal. Uma das complicações para o tratamento eficaz é a heterogeneidade do próprio tumor. O tratamento inicial pode causar regressão, mas células resistentes permanecem e retomam o crescimento original. Tal complexidade, somada à fragilidade da região encefálica, torna o tumor praticamente incurável, resultando em alta taxa de mortalidade (KAMIYA-MATSUOKA; GILBERT, 2015).

Em 2008 a organização *The Cancer Genome Atlas* publicou a maior análise genômica e transcricional integrada de GBM até então (MCLENDON *et al.*, 2008), cujos dados foram posteriormente refinados em Brennan e colegas (2013). O estudo de 2008 se iniciou com 587 amostras de biópsias que, após controle de qualidade, foram reduzidas a 206. Análise genômica integrativa definiu as principais alterações moleculares dessas amostras.

A análise identificou alta interconexão entre vias aberrantes, incluindo três principais: via Ras, p53 e pRb. Quanto a cópias gênicas, 59%, 70% e 66% das 206 amostras apresentaram alterações somáticas em genes importantes das vias Ras, p53 e pRb, respectivamente. Com dados de sequenciamento, provindos de 91 amostras, esses valores aumentaram para 88% (via Ras), 87% (via p53) e 78% (via pRb). Também foi observada uma chance maior que a puramente aleatória de que uma dada amostra apresentasse ao menos um gene aberrante em cada via ($p=0,0018$). De fato, 74% das amostras apresentaram aberrações nas três vias simultaneamente, o que sugere que sua tripla desregulação é um mecanismo fundamental para a patogênese de GBM.

Na via Ras, foi encontrada notável amplificação do gene de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor* – 45% das amostras), enquanto proteínas anti-mitogênicas da via (como NF1 e PTEN) apresentaram mutações ou deleções homólogas. Na via p53, mutações ou deleções homólogas foram encontradas em *CDKN2A* (codificante para CDKN2A e p14^{ARF} – 49% das amostras) e *TP53* (35% das amostras), enquanto observou-se amplificação de *MDM2* e

MDM4 em 14 e 7% das amostras, respectivamente. Já na via pRb, deleção homóloga ou mutação foram encontradas nos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* (52 e 47%, respectivamente), e com menor frequência no próprio gene *RBI* (11%). Nessa via, amplificação de *CDK4* foi a mais frequente, alcançando 18% das amostras.

Tanto no estudo de 2008 quanto no de 2013 (MCLENDON *et al.* 2008; BRENNAN *et al.* 2013) observou-se uma tendência a alterações mutuamente excludentes dentro de cada via. Em outras palavras, a alteração de apenas um gene de cada via é suficiente para a progressão de GBM e alivia a pressão seletiva para a alteração de outros genes da mesma via.

1.7 Terapia Gênica

Terapia gênica foi uma técnica originalmente concebida visando curar doenças monogênicas pela transferência horizontal de cópia saudável do gene defeituoso. Provas-de-conceito e ensaios em humanos se iniciaram na segunda metade do século XX (WIRTH; PARKER; YLÄ-HERTTUALA, 2013), obtendo aprovação, em 1990, do FDA (*Food and Drug Administration*) para um ensaio clínico de terapia gênica contra deficiência de adenosina deaminase (ADA-SCID) (BLAESE *et al.*, 1995). Em 1999, a primeira morte relacionada a terapia gênica ocorreu; Jesse Gelsinger, portador de deficiência parcial de ornitina transcarbamilase, enzima envolvida com o metabolismo de nitrogênio no fígado, recebeu alta dose de adenovírus e seu sistema imune respondeu, levando-o a óbito por falência múltipla dos órgãos quatro dias depois (RAPER *et al.*, 2003; STOLBERG, 1999).

Atualmente, segundo o banco de dados *The Journal of Gene Medicine Clinical Trials* (<http://www.abedia.com/wiley/>), 65% dos testes clínicos em terapia gênica ao redor do mundo são voltados para o câncer, seguidos por doenças monogênicas (11,1% – figura 6). Isso demonstra uma mudança de foco na área desde sua concepção, mas que não é inesperada, visto que existem mais pacientes de câncer do que de cada doença monogênica, o que torna a demanda mais alta.

O repositório *The Journal of Gene Medicine Clinical Trials* não permite visualizar seus dados por doença, tornando necessária extração de dados por programação para se obter informações relativas especificamente ao câncer. A extração utilizou o *software* Microsoft

Excel (Office 365, *Microsoft Corporation*) e ocorreu em abril de 2018 seguindo as instruções de <https://www.howtoexcel.org/power-query/how-to-extract-data-from-multiple-webpages/>.

Com os dados em mãos, foi possível obter uma ideia das tendências mundiais em terapia gênica do câncer. Os quatro mecanismos de transferência mais utilizados são adenovírus, retrovírus, plasmídeos, e lentivírus (figura 7). A escolha do mecanismo depende de aspectos técnicos de produção, do tecido-alvo e do gene a ser entregue. Além disso, os dados de localização geográfica dos ensaios clínicos deixam claro que os Estados Unidos estão na liderança na área, com 67% dos estudos clínicos (figura 8). Apesar disso, há produtos gênicos aprovados na União Europeia e na China (WIRTH; PARKER; YLÄ-HERTTUALA, 2013).

A figura 9 destaca as estratégias mais utilizadas para terapia gênica do câncer nos estudos computados. O fato de que as três maiores são entrega de antígenos, citocinas e receptores deixa claro que a estratégia mais adotada é a imunomodulação, que consiste na ativação do sistema imune para combater o câncer, e inclui a produção de vacinas, manipulação de células apresentadoras de antígenos e a reprogramação de linfócitos T (WIRTH; YLÄ-HERTTUALA, 2014).

Logo em seguida estão as estratégias de supressores de tumor (utilizada neste projeto), genes suicidas e vírus oncolíticos. A entrega de genes supressores de tumor às células cancerosas consiste simplesmente em recuperar mecanismos anti-oncogênicos defeituosos nessas células. A entrega de genes suicidas, como timidina quinase de HSV (*Herpes Simplex Virus*), faz com que as células receptoras consigam metabolizar uma pró-droga inativa em droga ativa. Isso permite à droga atuar localmente, evitando os efeitos colaterais causados pela ação farmacológica no organismo inteiro (WIRTH; YLÄ-HERTTUALA, 2014). Por fim, a estratégia de vírus oncolíticos, também chamada de viroterapia, consiste em entregar versões modificadas de vírus selvagens capazes de se replicar apenas nas células-alvo. Dessa maneira, ao saírem da célula, as partículas virais a levam à morte por lise e podem infectar outras células-alvo (WIRTH; PARKER; YLÄ-HERTTUALA, 2013).

Figura 6 Estudos clínicos com terapia gênica ao redor do mundo separados por indicação (figura originária de *The Journal of Gene Medicine Clinical Trials* acessado em abril/2018).

Figura 7 Mecanismos de transferência utilizados em estudos clínicos de terapia gênica contra o câncer ao redor do mundo (gráfico construído com dados extraídos de *The Journal of Gene Medicine Clinical Trials*, acessado em abril/2018)

Figura 8 Distribuição geográfica dos estudos clínicos com terapia gênica contra o câncer (gráfico construído com dados extraídos de *The Journal of Gene Medicine Clinical Trials* acessado em abril/2018).

Figura 9 Estratégia terapêutica dos estudos clínicos com terapia gênica contra o câncer ao redor do mundo (gráfico construído com dados extraídos de *The Journal of Gene Medicine Clinical Trials* acessado: abril/2018)

1.7.1 Terapia Gênica de GBM

Atualmente, o tratamento indicado para GBM consiste em remoção cirúrgica seguida de rádio e quimioterapia. No entanto, a eficácia cirúrgica é frequentemente comprometida pela característica invasiva do tumor e por sua proximidade a estruturas anatômicas vitais (TOBIAS *et al.*, 2013). Dessa maneira, e considerando o prognóstico extremamente desfavorável da doença, o desenvolvimento de terapias alternativas se mostra urgente.

O campo de terapia gênica contra GBM tem atraído diversas pesquisas e se mostrado promissor, combinando estratégias de ação com estratégias de entrega. Algumas estratégias de ação testadas em laboratório são: genes suicidas, proteínas tóxicas, vetores oncolíticos, terapia gênica imunomodulatória, restauração de genes supressores de tumor e supressão de angiogênese (CASTRO *et al.*, 2014; KANE *et al.*, 2015; KING *et al.*, 2005; TOBIAS *et al.*, 2013). As estratégias de entrega também são diversas, incluindo vetores virais, como adenovírus, HSV-1, vírus adeno-associado-2 e vírus da doença de Newcastle; vetores não-virais, como nanopartículas e lipossomos; e células carregadoras, como células-tronco neurais e mesenquimais com tropismo pelo ambiente tumoral (CASTRO *et al.*, 2014; KANE *et al.*, 2015; KING *et al.*, 2005; TOBIAS *et al.*, 2013).

No que diz respeito a tratamento de GBM com supressores de tumor, a simples remediação de p53 por vetor adenoviral se mostrou eficaz em reduzir viabilidade celular *in vitro* e crescimento tumoral de GBM *in vivo* (KÖCK *et al.*, 1996), aumentou sua sensibilidade à droga BCNU (BIROCCIO *et al.*, 1999) e à irradiação por raios-X (D'AVENIA *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a entrega simultânea de p53 e os imunomoduladores GM-CSF e B7-1 pode surtir potente efeito supressor de tumor *in vitro* e *in vivo* (PAN *et al.* 2010; FENG *et al.* 2014). A transdução de CDKN2A também foi capaz de suprimir o crescimento de GBM *in vitro* e *in vivo* (ARAP *et al.* 1995; LEE *et al.* 2000), além de inibir sua capacidade invasiva (ADACHI *et al.*, 2002; CHINTALA *et al.*, 1997).

Em estudos clínicos, as duas maiores estratégias terapêuticas contra GBM são genes suicidas e imunomodulação, seguidas por vírus oncolíticos e genes supressores de tumor (figura 10). Os mecanismos de entrega variam pouco, com mais de 50% dos estudos utilizando retrovírus ou adenovírus (figura 11). Segundo a base de dados *The Journal of Gene Medicine Clinical Trials*, estudos clínicos contra GBM representam < 1% do total de estudos contra o câncer.

Figura 10 Estratégia terapêutica de estudos clínicos com terapia gênica contra GBM ao redor do mundo (gráfico construído com dados extraídos de *The Journal of Gene Medicine Clinical Trials* acessado em: abril/2018)

Figura 11 Mecanismos de transferência utilizados em estudos clínicos de terapia gênica contra GBM ao redor do mundo (gráfico construído com dados extraídos de *The Journal of Gene Medicine Clinical Trials* acessado em abril/2018)

1.7.2 Remediação Simultânea de p53 e CDKN2A através de Terapia Gênica

Com o desenvolvimento de técnicas de terapia gênica e com o entendimento de que p53 é frequentemente alterado no câncer, cogitou-se a ideia de remediá-lo como possível forma de tratamento (LIU *et al.* 1994; ZHANG *et al.* 1994; CLAYMAN *et al.* 1995). A ideia é explorada ainda hoje em ensaios clínicos (*The Journal of Gene Medicine Clinical Trials* – <http://www.abedia.com/wiley/>), e foi aprovada na China como biofármaco sob o nome comercial Gendicine™ (PENG, 2005). No entanto, resultados observados com apenas p53 não foram consistentes em todos os tipos de câncer testados, o que levou Volker Sandig e colegas a estudarem a co-transdução simultânea de p53 com o segundo gene mais alterado no câncer, CDKN2A (SANDIG *et al.*, 1997). O grupo testou a nova estratégia em linhagens de carcinoma hepatocelular e de cólon humanos, alcançando resultados mais consistentes que a transdução de cada gene individualmente.

O grupo observou que a co-transdução dos dois genes diminuiu significativamente a viabilidade celular de linhagens cancerosas, enquanto causou apenas sequestro em G₁ em fibroblastos primários saudáveis. Resultados similares foram observados *in vivo*. Após esse primeiro estudo, outros se seguiram utilizando a estratégia de co-transdução CDKN2A + p53 em câncer de pâncreas (GHANEH *et al.*, 2001), de bexiga (ZHU *et al.* 2002), de pulmão (WANG *et al.* 2001; BAI *et al.* 2000; WEN *et al.* 1999), e em linhagem eritroleucêmica (RUI; SU, 2002), sempre obtendo resultados favoráveis à nova abordagem. Nesses estudos determinou-se que o principal mecanismo de morte celular após transdução CDKN2A + p53 é por apoptose.

No entanto, a estratégia de co-transdução apresenta alguns pontos-fracos. Primeiramente, com ela não é possível garantir que todas as células-alvo recebam o mesmo número de cópias de cada gene. Em segundo lugar, os trabalhos acima utilizaram vetores adenovirais como veículo de entrega. Assim, caso o tratamento chegue à clínica, isso implica no uso do dobro da carga adenoviral, o que pode causar reação imunológica e levar à morte do paciente (STOLBERG, 1999).

Uma possível solução seria codificar ambas as proteínas simultaneamente em um único vetor, o que foi realizado pelo presente grupo em retrovírus (LEO *et al.*, 2003), e em adenovírus (GREGÓRIO, 2008). O construto utilizado foi CDKN2A^{IR}p53 expresso sob regulação do promotor de citomegalovírus (CMV). Dessa maneira, após a transcrição, uma única fita de

mRNA é formada codificando CDKN2A e p53 simultaneamente (figura 12). A tradução de CDKN2A é regulada pelo *cap* de 7-metil-guanosina comum a mRNAs eucarióticos. Já a tradução de p53 é regulada pelo elemento IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), uma sequência de bases não-codificante que adquire uma conformação secundária que permite a montagem ribossomal no meio da fita (DAVIES; KAUFMAN, 1992). Essa estratégia permite a tradução de ambas as proteínas a partir de um único mRNA.

Em seu trabalho de doutorado, Juliana Gregório (2008) comparou as estratégias de co-transdução CDKN2A + p53 e transdução com adenovírus bicistrônico AdCDKN2A^{IRES}p53 em linhagem de carcinoma pulmonar humano H358 (NSCLC). Os resultados obtidos revelaram marcante superioridade de AdCDKN2A^{IRES}p53 na indução de morte celular comparado à co-transdução CDKN2A + p53, o que levou o grupo a adotar a estratégia em estudos posteriores (XANDE *et al.* 2013, este trabalho).

Figura 12 Expressão gênica do vetor adenoviral bicistrônico AdCDKN2A^{IRES}p53 sintetizado por Gregório (2008). A nível de DNA, o vetor possui os genes CDKN2A e p53 separados por um elemento IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) e cuja transcrição é mediada pelo promotor de citomegalovírus (CMV). O sinal de poliadenilação de timidina quinase de HSV-1 está presente na região 3'. Com isso, uma única fita de mRNA é produzida capaz de traduzir CDKN2A e p53 simultaneamente. CDKN2A tem sua tradução coordenada pelo *cap* de 7-metil-guanosina, como naturalmente ocorre em mRNAs eucarióticos. A tradução de p53 é mediada pelo elemento IRES, que permite a montagem ribossomal no meio da fita. Assim, a nível de proteína, CDKN2A e p53 são expressos simultaneamente.

1.7.3 Vetores Adenovirais como Veículos de Transferência Gênica

Vetores adenovirais para transferência gênica se baseiam na biologia dos adenovírus selvagens. A estrutura da partícula adenoviral é formada por capsídeo não-envelopado icosaédrico formado por proteínas chamadas pentons e héxons. De cada vértice saem fibras responsáveis pela aderência à célula-alvo (MCCONNELL; IMPERIALE, 2004). A adesão da partícula à célula é mediada pela interação das fibras com o receptor CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*), uma proteína de adesão celular expressa em diversos tecidos (HOWITT; ANDERSON; FREIMUTH, 2003; HONDA *et al.* 2000). Depois da interação inicial, a entrada na célula é ativada pelas proteínas penton, que desencadeiam endocitose mediada por clatrina (MEIER *et al.*, 2002; STEWART, 1997). O ambiente ácido endossomal ocasiona o escape dos vírions ao citoplasma, que são então levados ao núcleo por dineínas e se ligam aos poros nucleares, injetando o genoma adenoviral no núcleo (KELKAR *et al.*, 2004; TROTMAN *et al.*, 2001).

O genoma adenoviral consiste em uma dupla-fita linear de DNA com aproximadamente 36 kb flanqueada por duas regiões não-codificantes chamadas ITR (*Inverted Terminal Repeat*). O genoma codifica proteínas iniciais (E1A, E1B, E2, E3 e E4), e tardias (L1, L2, L3, L4 e L5), sendo que o primeiro transcrito adenoviral é E1A, um inativador de pRb capaz de immortalizar a célula hospedeira. Outra função de E1A é induzir a transcrição de E1B, E2, E3 e E4. E1B apresenta atividade inibitória sobre p53; portanto, juntos, E1A e E1B forçam o início da fase S (na qual o genoma adenoviral é duplicado) e por isso possuem atividade oncogênica (MCCONNELL; IMPERIALE, 2004).

A região E2 codifica proteínas necessárias para a replicação do genoma viral, como DNA polimerase própria, proteína pré-terminal e uma proteína auxiliar de 72 kDa (DE JONG; VAN DER VLIET; BRENNKMAN, 2003). Os produtos da região E3 estão envolvidos com o escape do sistema imune, impedindo a apresentação de antígenos virais pela via MHC de classe I (BURGERT; MARYANSKI; KVIST, 1987; BENNETT *et al.* 1999). As proteínas E3 também possuem função de evitar apoptose induzida pelo sistema imune (MCCONNELL; IMPERIALE, 2004). A região E4 codifica diversos produtos que auxiliam as funções de E1A e E1B, além de possuírem funções relacionadas a transcrição, transformação celular e apoptose (CARVALHO, 1995; DOBNER *et al.*, 1996; MCCONNELL; IMPERIALE, 2004; QUERIDO, 2001; STRACKER; CARSON; WEITZMAN, 2002; TÄUBER; DOBNER, 2001).

Após a ação das proteínas iniciais, a expressão das regiões tardias começa. Os produtos desses genes são proteínas estruturais que iniciam a formação do capsídeo no citoplasma. A encapsulação do genoma viral é mediada por uma região chamada sequência de empacotamento (ou sequência ψ), que guia o genoma para o interior do capsídeo (MCCONNELL; IMPERIALE, 2004).

Desde a caracterização da primeira espécie de adenovírus (ROWE *et al.*, 1953), vetores adenovirais rapidamente emergiram como veículo de transferência gênica promissor. Dentre a grande variedade de vetores adenovirais conhecidos, os do sorotipo 5 são os mais bem-caracterizados e estudados (MCCONNELL; IMPERIALE, 2004; TATSIS; ERTL, 2004). Adenovírus foram considerados bons candidatos a veículos de terapia gênica por apresentarem amplo tropismo por células quiescentes e proliferantes, inabilidade de integrar no genoma hospedeiro, grande espaço de inserção do transgene e alta eficiência de produção (DORMOND; PERRIER; KAMEN, 2009). Desde o início de seu uso como vetor de transferência gênica, o genoma adenoviral selvagem foi progressivamente modificado para melhorar sua segurança e eficiência em aplicações terapêuticas.

Vetores adenovirais de primeira geração possuem deleção na região E1, dessa maneira tornando-os replicação-incompetentes e apropriados para uso terapêutico. Por esse motivo, a produção desses vetores depende de linhagem celular que expresse os produtos de E1 constitutivamente. A linhagem clássica utilizada para este propósito é 293, derivada de rim embrionário humano, que foi transformada pela região E1 adenoviral (RUSSELL *et al.*, 1977). Alguns vetores de primeira geração também possuem deleção na região E3 (JONES; SHENK, 1979), o que aumenta sua biossegurança e adiciona espaço para inserção do transgene.

Vetores de segunda geração foram sintetizados com deleções em múltiplos genes, incluindo E2 e E4, o que também aumentou sua capacidade de inserção do transgene (ARMENTANO *et al.*, 1997; GAO; YANG; WILSON, 1996; GORZIGLIA *et al.*, 1999; LUSKY *et al.*, 1998). A deleção de E2 diminui drasticamente a possibilidade de restauração da capacidade replicativa, aumentando sua segurança (AMALFITANO *et al.*, 1998; AMALFITANO; BEGY; CHAMBERLAIN, 1996; AMALFITANO; CHAMBERLAIN, 1997; GORZIGLIA *et al.*, 1996; SCHAACK *et al.*, 1995). Além disso, experimentos em camundongos imunocompetentes demonstraram expressão transgênica prolongada com o uso desses vetores (HU; SERRA; AMALFITANO, 1999).

Vetores adenovirais de terceira geração, também chamados *gutless*, possuem todas as regiões codificantes deletadas. A produção desses vetores depende de adenovírus auxiliares que expressem as proteínas virais, mas isso implica que a produção é frequentemente contaminada por vírus replicação-competentes. A proposta é promissora, mas necessita de mais estudos (MCCONNELL; IMPERIALE, 2004).

1.7.4 Vetores Lentivirais como Veículos de Transferência Gênica

Lentivírus são membros da família viral *Retroviridae*, que é caracterizada pelo uso de transcriptase reversa e integrase para inserção no genoma hospedeiro. A maioria dos vetores lentivirais utilizados em biotecnologia são derivados de HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus-1*), e, portanto, baseiam-se em sua biologia.

O genoma de HIV consiste em fita positiva de RNA de aproximadamente 9kb, sendo os três principais genes *gag*, *pol* e *env*. Outras duas proteínas importantes são Tat e Rev, responsáveis pela ativação transcricional e exportação nuclear de RNA, respectivamente. O genoma viral é flanqueado por duas regiões LTR (*Long Terminal Repeats*), necessárias para a retrotranscrição, integração genômica e transcrição proteica, além de possuir uma sequência ψ de empacotamento (SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012).

A partícula viral de HIV é envelopada e possui nucleocapsídeo que abriga o RNA genômico. As proteínas do nucleocapsídeo são codificadas por *gag* e *pol*, incluindo as estruturais, protease, transcriptase reversa e integrase. O gene *env* codifica as proteínas do envelope, necessárias para a ligação da partícula viral às células-alvo, que, no caso de HIV, são linfócitos CD4⁺ (SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012). Na produção de vetores lentivirais, o gene *env* pode ser substituído com o objetivo de se alterar o tropismo da partícula, por exemplo, com a proteína de aderência VSV-G (*Vesicular Stomatitis Virus envelope glycoprotein G*; BURNS *et al.* 1993).

O início da infecção por HIV-1 se dá com a ligação à célula-alvo com consequente fusão do envelope com a membrana plasmática. Então, o capsídeo se desfaz, liberando proteínas e o genoma viral no citoplasma. As fitas de RNA positivo são retrotranscritas em DNA de dupla-fita pela transcriptase reversa, que são importadas ao núcleo e integradas ao genoma

hospedeiro por intermédio das integrases (CIMARELLI; DARLIX, 2002; FANALES-BELASIO *et al.*, 2010; WARRILOW; TACHEDJIAN; HARRICH, 2009).

Com o genoma integrado, a expressão proteica viral se inicia utilizando a LTR-5' como promotor e *enhancer*. A expressão de Tat e Rev ocorre inicialmente, sendo que Tat auxilia na expressão e *spliceamento* das proteínas tardias, e Rev possui papel de exportina para seus mRNAs (MALIM *et al.*, 1989). Os produtos de *gag* e *pol* são traduzidos no citoplasma, enquanto os de *env* são traduzidos no retículo endoplasmático e inseridos em sua membrana, a fim de serem endereçados à membrana plasmática. As novas partículas virais, carregando proteínas funcionais e o genoma viral de RNA são formadas na membrana plasmática e saem da célula por brotamento (FANALES-BELASIO *et al.*, 2010; HASELTINE, 1988).

A transição do vírus HIV-1 selvagem para vetor lentiviral replicação-incompetente e seguro se deu progressivamente. Na primeira ocorrência de uso do vírus como vetor gênico, utilizou-se uma versão replicação-competente com substituição do gene *nef* pelo transgene clorafenicol acetiltransferase (TERWILLIGER *et al.*, 1989). Posteriormente, o genoma viral foi separado em duas partes contidas em plasmídeos, uma contendo DNA pró-viral de HIV-1 com deleção no gene *env* e inserção do transgene, e outra contendo o gene *env* (HELSETH *et al.*, 1990; PAGE; LANDAU; LITTMAN, 1990). Dessa maneira, os dois plasmídeos seriam necessários para produção viral, mas o vetor não se replicaria ao invadir a célula hospedeira por não conseguir expressar proteínas envelopares. Essa estratégia também permitiu a alteração do tropismo viral ao se substituir o plasmídeo *env* por outro com ligante mais abrangente, como VSV-G (AKKINA *et al.*, 1996).

Para aumentar a segurança e minimizar a possibilidade de geração de vírions replicação-competentes, o genoma lentiviral foi dividido novamente, dessa vez em três plasmídeos: um contendo *env* ou a proteína envelopar de escolha, um contendo o transgene, as sequências LTR e ψ , e um contendo o restante do genoma viral, sem as sequências LTR e ψ . Essa divisão permite a entrega do gene de interesse sem a expressão de proteínas virais. Além disso, também faz com que sejam necessários ao menos dois eventos recombinantes para restaurar a capacidade replicativa viral (SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012).

Com o avanço das pesquisas sobre o vetor, mais medidas foram aplicadas para se aumentar sua segurança e utilidade. Proteínas acessórias importantes para a patogênese, mas não para a replicação viral, foram deletadas (ZUFFEREY *et al.*, 1997); as regiões promotoras LTR foram alteradas de maneira a não ocasionar a expressão indesejada de genes do hospedeiro

(MIYOSHI *et al.* 1998; ZUFFEREY *et al.* 1998; IWAKUMA; CUI; CHANG, 1999); mais uma divisão genômica foi realizada, dessa vez para quatro plasmídeos, aumentando a segurança do sistema (DULL *et al.* 1998; KIM *et al.* 1998; ESCARPE *et al.* 2003); entre outras (revisado em Sakuma, Barry, e Ikeda, 2012).

A utilização de vetores lentivirais apresenta vantagens na área biotecnológica e medicinal, visto que o sistema é capaz de integrar o transgene ao genoma hospedeiro, tornando sua expressão constitutiva, e a partícula viral pode transduzir células em divisão ou não. Comparados a outros retrovírus, lentivírus possuem tendência a se integrarem com mais segurança, evitando a expressão indesejada de genes vizinhos, especialmente se as regiões LTR forem otimizadas (MIYOSHI *et al.* 1998; ZUFFEREY *et al.* 1998; IWAKUMA, CUI, CHANG 1999). Além disso, lentivírus possuem tropismo facilmente modificável. Essas características tornam o sistema bastante atrativo para aplicações biotecnológicas e terapêuticas.

1.8 Sistema GFP-DEVD-ssGLUC como Sensor de Atividade de Caspase-3/7

Gaussia luciferase (GLUC) é uma luciferase originalmente produzida por um crustáceo marinho, *Gaussia princeps* (Figura 13a) e consiste em uma proteína monomérica de 185 aminoácidos e 19,9 kDa capaz de ser secretada pela célula devido à presença de um sinal de secreção (ss) N-terminal, além de ser a menor luciferase de que se tem conhecimento (SZENT-GYORGYI *et al.*, 1999). Assim como outras luciferases, GLUC utiliza oxigênio para oxidar seu substrato, coelenterazina (figura 13b), produzindo luz com pico a 480 nm independentemente de ATP, e em sua forma humanizada brilha até 1000 vezes mais intensamente que outras luciferases, como *Firefly* luciferase e *Renilla* luciferase, dependendo das condições experimentais (TANNOUS *et al.*, 2005).

A enzima foi humanizada e caracterizada pelo grupo de Bakhos Tannous (2005), e rapidamente suas vantagens técnicas foram aproveitadas para uso como sensor de processos celulares, tais como viabilidade celular (TANNOUS *et al.*, 2005), sensor de interação proteína-proteína (REMY; MICHNICK, 2006), monitoramento da via secretória e de estresse do retículo endoplasmático (BADR *et al.*, 2007), imageamento *in vivo* guiado por anticorpos (VENISNIK *et al.*, 2007), sensor de processos celulares *in vivo* (TANNOUS, 2009; WURDINGER *et al.*, 2008), medidor da atividade de promotores (RUECKER *et al.*, 2008),

sensor de regulação por miRNAs (LEE *et al.* 2008; MORLIGHEM; PETIT; TZERTZINIS, 2007), sensor de apoptose intrínseca e extrínseca *in vitro* e *in vivo* (NIERS *et al.*, 2011), replicação viral (ECKERT *et al.*, 2014; KOUTSOUDAKIS *et al.*, 2012) e bacteriana (LIU *et al.* 2014), entre outros.

Figura 13 Bioluminescência de *Gaussia* luciferase. (A) Ilustração do copépode marinho *Gaussia princeps* (www.researchgate.net/figure/7/277406144_fig1_Fig-1-Picture-of-Gaussia-princeps-by-Professor-Russel-Hopcroft-University-of-Alaska) e (B) Reação química do substrato coelenterazina catalizada por GLUC (www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/reporter-gene-assays/luciferase-assays/gaussia-luciferase-assays-vectors.html)

O presente estudo utiliza o sensor de apoptose desenvolvido por Niers e colegas (2011). Uma proteína quimérica (GFP-DEVD-ssGLUC) foi sintetizada contendo em sua porção C-terminal a luciferase GLUC e seu sinal secretório (ssGLUC) ligados a um GFP N-terminal por quatro aminoácidos, ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), valina (V) e ácido aspártico (D), que juntos compõem o sítio de clivagem de caspase-3/7 (figura 14). A presença de GFP N-terminal impede que a porção ssGLUC seja corretamente dobrada no citoplasma, fazendo com que a proteína quimérica GFP-DEVD-ssGLUC não apresente atividade de luciferase. Após indução de apoptose e ativação de caspase-3/7, o domínio DEVD é clivado e ssGLUC, agora livre, é transportado ao retículo endoplasmático, onde é corretamente dobrado por chaperonas e endereçado à secreção, podendo ser detectado no meio extracelular por reação com coelenterazina (NIERS *et al.*, 2011).

O amplicon GFP-DEVD-ssGLUC foi então clonado em vetor lentiviral (LvGFP-DEVD-GLUC) sob a ação do promotor de citomegalovírus (CMV). Para ser utilizado, o sensor precisa ser transduzido às células-alvo, que devem ser selecionadas para presença de GFP utilizando citometria de fluxo ativada por fluorescência (FACS).

A eficácia do sistema foi comprovada pela detecção de GLUC no sobrenadante, mas o sistema também pode ser usado para o imageamento de células aderidas (devido a GLUC presente no lúmen das organelas secretórias) e para ensaios *in vivo* em que GLUC é detectado no sangue do animal, demonstrando a versatilidade do sistema (NIERS *et al.*, 2011). Além disso, a possibilidade de detecção de apoptose por aferição do sobrenadante deixa as células aderidas livres para utilização em ensaios adicionais, o que na literatura é conhecido como multiplex de experimentos. A possibilidade de multiplex foi testada no presente estudo.

Figura 14 Expressão de GFP-DEVD-ssGLUC, adaptado de Niers e colegas, 2011. O produto do gene é uma proteína quimérica possuidora de GFP N-terminal e ssGLUC C-terminal, ligados pelo motivo tetra-aminoacídico DEVD (ver texto). Com a ativação de caspase-3/7, DEVD é clivado e ssGLUC é endereçado ao retículo endoplasmático, onde é dobrado e secretado no meio extracelular. CMV: promotor de citomegalovírus.

2 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo suportam a ideia de que a expressão simultânea de CDKN2A e p53 em células cancerosas possui efeito sinérgico na indução de morte celular comparado a cada gene individualmente, mesmo em linhagens com perfis distintos de p53. No entanto, o efeito foi menor em linhagem p53^{wt/wt}, sugerindo uma possível resistência natural ao tratamento em linhagens com esse perfil.

Outro ponto importante foi que uma parcela expressiva da população celular remanescente entrou em sequestro em G₁ e senescência celular, o que pode ser favorável em contexto clínico contra o câncer visto que senescência é um estado não-proliferativo. No entanto, células senescentes podem ser prejudiciais ao tumor por secretarem fatores de crescimento que afetam as células vizinhas (item 1.4). Dessa maneira, deve-se buscar maneiras de melhorar a estratégia terapêutica de modo a desviar ao máximo sua atuação para indução de morte celular.

Sobre o sensor de caspase-3/7 GFP-DEVD-ssGLUC, algumas observações importantes devem ser destacadas. O sensor produziu resultados consistentes ao longo dos experimentos, o que demonstra sua robustez. No entanto, ao utilizá-lo para se caracterizar um tratamento, deve-se ter em mente que indução de apoptose não é o único processo capaz de gerar sinal. Neste projeto, a linhagem U87^{DEVD-GLUC} demonstrou possuir uma ativação basal de caspases que resulta em secreção de GLUC, mesmo sem receber tratamento. Além disso, a própria presença de vetores adenovirais, mesmo carregando transgene inócuo (como LacZ), levou à ativação de caspases em todas as linhagens testadas (U87^{DEVD-GLUC}, U251^{DEVD-GLUC}, T98G^{DEVD-GLUC} e H1299^{DEVD-GLUC}), mas sem reduzir a viabilidade celular.

Outro resultado notável foi a alta secreção de GLUC em células que receberam CDKN2A, resultado que se correlacionou com a indução de senescência por esse transgene. Isso aponta, apesar de não provar definitivamente, para uma possível correlação entre ativação de caspases e senescência.

Além disso, deve-se ter em mente que a secreção de GLUC nos casos acima (atividade basal de caspases, reação intracelular ao vetor e senescência celular) é constante e durável, enquanto sua secreção durante a apoptose é finita, além de poder se correlacionar não apenas com a quantidade de células apoptóticas de uma população, mas com a duração do processo em cada célula. Dessa maneira, em tratamentos que induzem simultaneamente mais de um

processo celular com ativação de caspases, como no caso de AdCDKN2A^{IR}ESp53 (capaz de induzir apoptose e senescência, e possivelmente outras reações celulares não testadas aqui, como autofagia), os resultados de GLUC não podem ser utilizados para quantificar especificamente um processo ou outro, mas sim a combinação de todos os processos ocorrendo simultaneamente na população celular.

Este estudo deu mais um passo na caracterização do vetor adenoviral bicistrônico AdCDKN2A^{IR}ESp53, aproximando-o da clínica, e ofereceu uma moldura para as vantagens e desvantagens no uso do sensor de caspases GFP-DEVD-GLUC.

REFERÊNCIAS*

- ADACHI, Y. *et al.* Suppression of glioma invasion and growth by adenovirus-mediated delivery of a bicistronic construct containing antisense uPAR and sense p16 gene sequences. **Oncogene**, v. 21, n. 1, p. 87–95, 15 jan. 2002.
- AKKINA, R. K. *et al.* High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. **Journal of virology**, v. 70, n. 4, p. 2581–5, abr. 1996.
- AMALFITANO, A. *et al.* Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. **Journal of virology**, v. 72, n. 2, p. 926–33, fev. 1998.
- AMALFITANO, A.; BEGY, C. R.; CHAMBERLAIN, J. S. Improved adenovirus packaging cell lines to support the growth of replication-defective gene-delivery vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 8, p. 3352–6, 16 abr. 1996.
- AMALFITANO, A.; CHAMBERLAIN, J. S. Isolation and characterization of packaging cell lines that coexpress the adenovirus E1, DNA polymerase, and preterminal proteins: implications for gene therapy. **Gene therapy**, v. 4, n. 3, p. 258–63, mar. 1997.
- AMELIO, I.; MELINO, G. The p53 family and the hypoxia-inducible factors (HIFs): Determinants of cancer progression. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 40, n. 8, p. 425–434, 2015.
- ARAP, W. *et al.* Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth. **Cancer research**, v. 55, n. 6, p. 1351–4, 15 mar. 1995.
- ARAVINTHAN, A. *et al.* The senescent hepatocyte gene signature in chronic liver disease. **Experimental Gerontology**, v. 60, p. 37–45, dez. 2014.
- ARAVINTHAN, A. Cellular senescence: a hitchhiker's guide. **Human Cell**, v. 28, n. 2, p. 51–64, 18 abr. 2015.
- ARMENTANO, D. *et al.* Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors. **Journal of virology**, v. 71, n. 3, p. 2408–16, mar. 1997.
- ASHCROFT, M.; KUBBUTAT, M. H.; VOUSDEN, K. H. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 3, p. 1751–8, 1 mar. 1999.
- BADKE, G. L. *et al.* Glioblastoma multiforme em idosos: uma revisão sobre seu tratamento com ênfase na abordagem cirúrgica. **Arq Bras Neurocir**, v. 33, n. 1, p. 45–51, 2014.
- BADR, C. E. *et al.* A highly sensitive assay for monitoring the secretory pathway and ER stress. **PLoS one**, v. 2, n. 6, p. e571, 27 jun. 2007.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

BAI, X. *et al.* Effects of adenovirus-mediated p16 and p53 genes transfer on apoptosis and cell cycle of lung carcinoma cells. **Chinese journal of pathology**, v. 29, n. 5, p. 354–8, out. 2000.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483–495, fev. 2005.

BALIGA, B. C.; READ, S. H.; KUMAR, S. The biochemical mechanism of caspase-2 activation. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, n. 11, p. 1234–1241, 6 nov. 2004.

BARBOZA, J. A. *et al.* p21 delays tumor onset by preservation of chromosomal stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 52, p. 19842–19847, 26 dez. 2006.

BARBOZA, J. A. *et al.* Mdm2 and Mdm4 Loss Regulates Distinct p53 Activities. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 947–954, 1 jun. 2008.

BARLEV, N. A. *et al.* Acetylation of p53 Activates Transcription through Recruitment of Coactivators/Histone Acetyltransferases. **Molecular Cell**, v. 8, n. 6, p. 1243–1254, dez. 2001.

BARTKOVA, J. *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 864–870, 14 abr. 2005.

BARTKOVA, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 633–637, 30 nov. 2006.

BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 5, p. 961–976, maio 2005.

BENNETT, D. C. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3063–3069, 19 maio 2003.

BENNETT, E. M. *et al.* Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 9, p. 5049–52, 1 maio 1999.

BERGSBAKEN, T.; COOKSON, B. T. Macrophage activation redirects Yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 11, p. e161, nov. 2007.

BILLECKE, C. A. *et al.* Lack of functional pRb results in attenuated recovery of mRNA synthesis and increased apoptosis following UV radiation in human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 21, n. 29, p. 4481–4489, 27 jul. 2002.

BIROCCIO, A. *et al.* Increase of BCNU sensitivity by wt-p53 gene therapy in glioblastoma lines depends on the administration schedule. **Gene therapy**, v. 6, n. 6, p. 1064–72, jun. 1999.

BLAESE, R. M. *et al.* T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results After 4 Years. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 475–480, 1995.

BOSCO, E. E. Differential role of RB in response to UV and IR damage. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 5, p. 1581–1592, 8 mar. 2005.

BOUCHIER-HAYES, L. *et al.* Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity. **Molecular cell**, v. 35, n. 6, p. 830–40, 24 set. 2009.

BRAIG, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 660–665, ago. 2005.

BRATTON, S. B. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 5, p. 998–1009, 1 mar. 2001.

BRATTON, S. B.; SALVESEN, G. S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. **Journal of cell science**, v. 123, n. Pt 19, p. 3209–14, 1 out. 2010.

BRENNAN, C. W. *et al.* The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 462–477, 10 out. 2013.

BRENNAN, M. A.; COOKSON, B. T. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 31–40, out. 2000.

BROOKS, C. L.; GU, W. p53 Ubiquitination: Mdm2 and Beyond. **Molecular Cell**, v. 21, n. 3, p. 307–315, fev. 2006.

BROSH, R.; ROTTER, V. When mutants gain new powers: News from the mutant p53 field. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 701–713, 2009.

BROWN, C. J. *et al.* Reactivation of p53: from peptides to small molecules. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 1, p. 53–62, jan. 2011.

BROWN, J. P. Bypass of Senescence After Disruption of p21CIP1/WAF1 Gene in Normal Diploid Human Fibroblasts. **Science**, v. 277, n. 5327, p. 831–834, 8 ago. 1997.

BUDANOV, A. V. The Role of Tumor Suppressor p53 in the Antioxidant Defense and Metabolism. In: DEB, S. P.; DEB, S. (Eds.). . **Mutant p53 and MDM2 in Cancer**. Subcellular Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. v. 85p. 337–358.

BURGERT, H.-G.; KVIST, S. An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. **Cell**, v. 41, n. 3, p. 987–997, jul. 1985.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 9, p. 671–682, 24 set. 2008.

BURN, S. F. Detection of β -Galactosidase Activity: X-gal Staining. In: MICHOS, O. (Ed.). . **Methods in Molecular Biology**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 886p. 241–250.

BURNS, J. C. *et al.* Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 8033–8037, 1 set. 1993.

BUSS, R. R.; SUN, W.; OPPENHEIM, R. W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. **Annual review of neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 1–35, 21 jul. 2006.

BYKOV, V. J. N. *et al.* Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. **Nature medicine**, v. 8, n. 3, p. 282–8, 1 mar. 2002.

CAMPISI, J. Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 513–522, fev. 2005.

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 729–740, 1 set. 2007.

CARVALHO, T. Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. **The Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 1, p. 45–56, 1 out. 1995.

CASTRO, M. G. *et al.* Adenoviral vector-mediated gene therapy for gliomas: coming of age. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 14, n. 9, p. 1241–1257, 29 set. 2014.

ČEŠKOVÁ, P. *et al.* On the Mechanism of Sequence-specific DNA-dependent Acetylation of p53: The Acetylation Motif is Exposed upon DNA Binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 2, p. 442–456, 24 mar. 2006.

CHAN, F. K. *et al.* Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 5, p. 2682–8, maio 1995.

CHAN, W. M. Ubiquitination of p53 at Multiple Sites in the DNA-Binding Domain. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 1, p. 15–25, 1 jan. 2006.

CHAPDELAINE, J. M. MTT reduction - a tetrazolium-based colorimetric assay for cell survival and proliferation. **Molecular Devices**, p. 1–6, 2011.

CHEHAB, N. H. *et al.* Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 24, p. 13777–82, 23 nov. 1999.

CHEN, Q. *et al.* Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 10, p. 4337–4341, 9 maio 1995.

CHEN, Q.; AMES, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 10, p. 4130–4134, 10 maio 1994.

CHEN, Q. M. *et al.* Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. **Biochemical Journal**, v. 332, n. 1, p. 43–50, 15 maio 1998.

CHEN, Q. M. *et al.* Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. **Journal of cell science**, v. 113, p. 4087–97, nov. 2000.

CHEN, Q. M. Replicative Senescence and Oxidant-Induced Premature Senescence: Beyond the Control of Cell Cycle Checkpoints. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, n. 1, p. 111–125, 25 jan. 2006.

CHEN, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 725–730, ago. 2005.

CHICAS, A. *et al.* Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. **Cancer cell**, v. 17, n. 4, p. 376–87, 13 abr. 2010.

CHINTALA, S. K. *et al.* Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer suppresses glioma invasion in vitro. **Oncogene**, v. 15, n. 17, p. 2049–57, 23 out. 1997.

CHIPUK, J. E. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. **Science**, v. 303, n. 5660, p. 1010–1014, 13 fev. 2004.

CHIPUK, J. E. PUMA Couples the Nuclear and Cytoplasmic Proapoptotic Function of p53. **Science**, v. 309, n. 5741, p. 1732–1735, 9 set. 2005.

CHIPUK, J. E. *et al.* The BCL-2 Family Reunion. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 299–310, 12 fev. 2010.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 4, p. 157–164, abr. 2008.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Cell Cycle**, v. 8, n. 17, p. 2692–2696, 28 set. 2009.

CHO, Y. *et al.* Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science**, v. 265, n. 5170, p. 346–355, 15 jul. 1994.

CIMARELLI, A.; DARLIX, J. L. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 59, n. 7, p. 1166–84, jul. 2002.

CIMMINO, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 39, p. 13944–13949, 27 set. 2005.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 15 mar. 2010.

CLARK, M. J. *et al.* U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 1, p. e1000832, 29 jan. 2010.

CLAYMAN, G. L. *et al.* In vivo molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck squamous carcinoma. **Cancer research**, v. 55, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 1995.

COLLADO, M. *et al.* Inhibition of the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway Induces a Senescence-like Arrest Mediated by p27 Kip1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 21960–21968, 21 jul. 2000.

COLLADO, M. *et al.* Senescence in premalignant tumours. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 642–642, ago. 2005.

COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 223–233, jul. 2007.

COOKSON, B. T.; BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 113–114, mar. 2001.

COPPÉ, J.-P. *et al.* Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 29568–29574, 6 out. 2006.

COPPÉ, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. e301, 2 dez. 2008.

COPPÉ, J.-P. *et al.* The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, n. 1, p. 99–118, jan. 2010.

CORSON, T. W.; GALLIE, B. L. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 46, n. 7, p. 617–634, jul. 2007.

COSME-BLANCO, W. *et al.* Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. **EMBO reports**, v. 8, n. 5, p. 497–503, 30 maio 2007.

CRAWFORD, E. D.; WELLS, J. A. Caspase Substrates and Cellular Remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 1055–1087, 7 jul. 2011.

D'AVENIA, P. *et al.* Tp53-gene transfer induces hypersensitivity to low doses of X-rays in glioblastoma cells: a strategy to convert a radio-resistant phenotype into a radiosensitive one. **Cancer letters**, v. 231, n. 1, p. 102–112, 8 jan. 2006.

DAI, C. Y.; ENDERS, G. H. p16INK4a can initiate an autonomous senescence program. **Oncogene**, v. 19, n. 13, p. 1613–1622, 2000.

DANILOVA, N.; SAKAMOTO, K. M.; LIN, S. p53 family in development. **Mechanisms of Development**, v. 125, n. 11–12, p. 919–931, nov. 2008.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BEDNER, E.; TRAGANOS, F. Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. **Methods in cell biology**, v. 63, p. 527–46, 2001.

DAVALOS, A. R. *et al.* Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 2, p. 273–283, 13 jun. 2010.

DAVIES, M. V.; KAUFMAN, R. J. Internal translation initiation in the design of improved expression vectors. **Current opinion in biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 512–7, out. 1992.

DE GROOT, J. F. High-grade Gliomas. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 21, n. 2, p. 332–344, abr. 2015.

DE JONG, R. N.; VAN DER VLIET, P. C.; BRENKMAN, A. B. Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions. In: DOERFLER, W.; BÖHM, P. (Eds.). . **Current topics in microbiology and immunology**. Berlin: Springer, 2003. v. 272p. 187–211.

DEWSON, G. *et al.* To Trigger Apoptosis, Bak Exposes Its BH3 Domain and Homodimerizes via BH3:Groove Interactions. **Molecular Cell**, v. 30, n. 3, p. 369–380, maio 2008.

DEWSON, G. *et al.* Bak Activation for Apoptosis Involves Oligomerization of Dimers via Their $\alpha 6$ Helices. **Molecular Cell**, v. 36, n. 4, p. 696–703, nov. 2009.

DI MICCO, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 638–642, 30 nov. 2006.

DICKENS, L. S. *et al.* The ‘complexities’ of life and death: Death receptor signalling platforms. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 11, p. 1269–1277, jul. 2012.

DIMARAS, H. *et al.* Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 10, p. 1363–1372, 15 maio 2008.

DIMRI, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9363–7, 26 set. 1995.

DOBNER, T. *et al.* Blockage by Adenovirus E4orf6 of Transcriptional Activation by the p53 Tumor Suppressor. **Science**, v. 272, n. 5267, p. 1470–1473, 7 jun. 1996.

DONEHOWER, L. A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**, v. 356, n. 6366, p. 215–221, 19 mar. 1992.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 110, n. 5, p. 525–41, 1 maio 2006.

DORMOND, E.; PERRIER, M.; KAMEN, A. From the first to the third generation adenoviral vector: What parameters are governing the production yield? **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 133–144, 2009.

DOWNWARD, J. Cell cycle: Routine role for Ras. **Current Biology**, v. 7, n. 4, p. R258–R260, 1 abr. 1997.

DULL, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **Journal of virology**, v. 72, n. 11, p. 8463–71, nov. 1998.

DUNCAN, S. J. *et al.* Isolation and Structure Elucidation of Chlorofusin, a Novel p53-MDM2 Antagonist from a *Fusarium* sp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 4, p. 554–560, 31 jan. 2001.

ECKERT, N. *et al.* Influenza A Virus Encoding Secreted *Gaussia* Luciferase as Useful Tool to Analyze Viral Replication and Its Inhibition by Antiviral Compounds and Cellular Proteins. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97695, 19 maio 2014.

ERSTER, S. *et al.* In Vivo Mitochondrial p53 Translocation Triggers a Rapid First Wave of Cell Death in Response to DNA Damage That Can Precede p53 Target Gene Activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 15, p. 6728–6741, 1 ago. 2004.

ESCARPE, P. *et al.* Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations. **Molecular Therapy**, v. 8, n. 2, p. 332–341, ago. 2003.

ESKES, R. *et al.* Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. **Molecular and Cellular Biology**, 2000.

ESPINOSA, J. M. Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. **Oncogene**, v. 27, n. 29, p. 4013–4023, 18 jul. 2008.

EZHEVSKY, S. A. *et al.* Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 20, p. 10699–10704, 30 set. 1997.

EZHEVSKY, S. A. *et al.* Differential Regulation of Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein by G1 Cyclin-Dependent Kinase Complexes In Vivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 14, p. 4773–4784, 15 jul. 2001.

FAGAGNA, F. D'ADDA DI *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. **Nature**, v. 426, n. 6963, p. 194–198, 5 nov. 2003.

FAN, Q.-D.; WU, G.; LIU, Z.-R. Dynamics of Posttranslational Modifications of p53. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

FANALES-BELASIO, E. *et al.* HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 46, n. 1, p. 5–14, 2010.

FAUSTIN, B. *et al.* Reconstituted NALP1 Inflammasome Reveals Two-Step Mechanism of Caspase-1 Activation. **Molecular Cell**, v. 25, n. 5, p. 713–724, mar. 2007.

FENG, S. *et al.* Recombinant adenoviral vector expressing human wild-type p53, GM-CSF, and B7-1 genes suppresses the growth of glioma in vivo. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 5, p. 4411–7, 10 maio 2014.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. 343–346, 2016.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1812–1825, nov. 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 9 nov. 2000.

FOLLIS, A. V. *et al.* PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 3, p. 163–168, 20 mar. 2013.

FOLLIS, A. V. *et al.* The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 21, n. 6, p. 535–543, 11 jun. 2014.

FORST, D. A. *et al.* Low-grade gliomas. **The oncologist**, v. 19, n. 4, p. 403–13, 1 abr. 2014.

FRANCHI, L. *et al.* The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3, p. 241–247, 1 mar. 2009.

FRANCHI, L.; MUÑOZ-PLANILLO, R.; NÚÑEZ, G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. **Nature Immunology**, v. 13, n. 4, p. 325–332, 19 abr. 2012.

FRIEDMANN, T.; ROBLIN, R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? **Science**, v. 175, n. 4025, p. 949–955, 3 mar. 1972.

FRIPPIAT, C. *et al.* Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2531–7, 26 jan. 2001.

FUEYO, J. *et al.* Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer induces growth arrest and modifies the transformed phenotype of glioma cells. **Oncogene**, v. 12, n. 1, p. 103–10, 4 jan. 1996.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 15 jan. 2012.

GAO, G. P.; YANG, Y.; WILSON, J. M. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. **Journal of virology**, v. 70, n. 12, p. 8934–8943, dez. 1996.

GATZA, C. *et al.* Tumor Suppressor Dosage Regulates Stem Cell Dynamics during Aging. **Cell Cycle**, v. 6, n. 1, p. 52–55, 28 jan. 2007.

GHANEH, P. *et al.* Adenovirus-mediated transfer of p53 and p16(INK4a) results in pancreatic cancer regression in vitro and in vivo. **Gene therapy**, v. 8, n. 3, p. 199–208, 1 fev. 2001.

GIACOMELLI, C. *et al.* New insights into the anticancer activity of carnosol: p53 reactivation in the U87MG human glioblastoma cell line. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 74, p. 95–108, maio 2016.

GITENAY, D.; LALLET-DAHER, H.; BERNARD, D. Caspase-2 regulates oncogene-induced senescence. **Oncotarget**, v. 5, n. 14, p. 5845–7, 30 jul. 2014.

GODAR, S. *et al.* Growth-Inhibitory and Tumor- Suppressive Functions of p53 Depend on Its Repression of CD44 Expression. **Cell**, v. 134, n. 1, p. 62–73, jul. 2008.

GOEHE, R. W. *et al.* The Autophagy-Senescence Connection in Chemotherapy: Must Tumor Cells (Self) Eat Before They Sleep? **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, n. 3, p. 763–778, 1 dez. 2012.

GOLDSTEIN, J. C. *et al.* The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 3, p. 156–162, 1 mar. 2000.

GOLOMB, L.; VOLAREVIC, S.; OREN, M. p53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. **FEBS Letters**, v. 588, n. 16, p. 2571–2579, 19 ago. 2014.

GOLUBOVSKAYA, V. M.; CANCE, W. G. Focal adhesion kinase and p53 signaling in cancer cells. **International review of cytology**, v. 263, n. 07, p. 103–53, 2007.

GOMEZ-MANZANO, C. *et al.* Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. **Cancer research**, v. 56, n. 4, p. 694–9, 15 fev. 1996.

GONZALEZ, S.; SERRANO, M. A New Mechanism of Inactivation of the INK4/ARF Locus. **Cell Cycle**, v. 5, n. 13, p. 1382–1384, 28 jul. 2006.

GOOKIN, S. *et al.* A map of protein dynamics during cell-cycle progression and cell-cycle exit. **PLoS Biology**, v. 15, n. 9, p. e2003268, 11 set. 2017.

GORGOLIS, V. G. *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 907–913, 14 abr. 2005.

GORZIGLIA, M. I. *et al.* Elimination of both E1 and E2 from adenovirus vectors further improves prospects for in vivo human gene therapy. **Journal of virology**, v. 70, n. 6, p. 4173–8, jun. 1996.

GORZIGLIA, M. I. *et al.* Generation of an adenovirus vector lacking E1, e2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 6048–55, jul. 1999.

GRAUPNER, V. *et al.* Differential regulation of the proapoptotic multidomain protein Bak by p53 and p73 at the promoter level. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 7, p. 1130–1139, 14 jul. 2011.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 12, p. a006080, 1 dez. 2015.

GREGÓRIO, J. C. **Estudo do efeito da remediação simultânea dos genes p16/ INK4a e p53 mediada pelo adenovírus bicistrônico Adp16IRESp53 em um modelo de carcinoma de pulmão humano.** 2008. 138 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GU, Y.; TURCK, C. W.; MORGAN, D. O. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 707–10, 16 dez. 1993.

GUAN, K. L. *et al.* Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. **Genes & Development**, v. 8, n. 24, p. 2939–2952, 15 dez. 1994.

HAGN, F. *et al.* BclxL Changes Conformation upon Binding to Wild-type but Not Mutant p53 DNA Binding Domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 5, p. 3439–3450, 29 jan. 2010.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. **Advances in Cancer Research**, v. 77, n. C, p. 81–137, 1999.

HAINAUT, P.; PFEIFER, G. P. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 11, p. a026179, 1 nov. 2016.

HAMPEL, B. *et al.* Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. **Aging Cell**, v. 4, n. 6, p. 325–330, dez. 2005.

HANNON, G. J.; BEACH, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 257–61, 15 set. 1994.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, n. 2, p. 203–210, 1989.

HARA, E. *et al.* Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 3, p. 859–867, mar. 1996.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, n. 6274, p. 458–460, 31 maio 1990.

HARRIS, C. C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1187–98, jun. 1996.

HARRIS, C. C.; HOLLSTEIN, M. Clinical Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 18, p. 1318–1327, 28 out. 1993.

HASELTINE, W. A. Replication and pathogenesis of the AIDS virus. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, v. 1, n. 3, p. 217–40, 1988.

HAUPT, S.; HAUPT, Y. P53 at the start of the 21st century: lessons from elephants. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 2041, 22 nov. 2017.

HAUPT, Y. *et al.* Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 296–299, 15 maio 1997.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, n. 3, p. 585–621, dez. 1961.

HELSETH, E. *et al.* Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants. **Journal of virology**, v. 64, n. 5, p. 2416–20, maio 1990.

HERBIG, U. Cellular Senescence in Aging Primates. **Science**, v. 311, n. 5765, p. 1257–1257, 3 mar. 2006.

HEWITT, G. *et al.* Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, p. 708, 28 jan. 2012.

HIRAI, H. *et al.* Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 5, p. 2672–81, maio 1995.

HOARE, M.; YOUNG, A. R. J.; NARITA, M. Autophagy in cancer: having your cake and eating it. **Seminars in cancer biology**, v. 21, n. 6, p. 397–404, dez. 2011.

HONDA, R. Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 1, p. 22–27, 4 jan. 1999.

HONDA, R.; TANAKA, H.; YASUDA, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. **FEBS Letters**, v. 420, n. 1, p. 25–27, 22 dez. 1997.

HONDA, T. *et al.* The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. **Brain research. Molecular brain research**, v. 77, n. 1, p. 19–28, 14 abr. 2000.

HORN, H. F.; VOUSDEN, K. H. Coping with stress: multiple ways to activate p53. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1306–1316, 26 fev. 2007.

HORNUNG, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 514–518, 26 mar. 2009.

HOWITT, J.; ANDERSON, C. W.; FREIMUTH, P. Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 272, p. 331–64, 2003.

HU, H.; SERRA, D.; AMALFITANO, A. Persistence of an [E1-, polymerase-] adenovirus vector despite transduction of a neoantigen into immune-competent mice. **Human gene therapy**, v. 10, n. 3, p. 355–64, 10 fev. 1999.

HU, W. *et al.* p53 regulates maternal reproduction through LIF. **Nature**, v. 450, n. 7170, p. 721–724, 29 nov. 2007.

HUANG, L. C.; CLARKIN, K. C.; WAHL, G. M. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 10, p. 4827–4832, 14 maio 1996.

HUANG, Q. *et al.* Dipeptide analysis of p53 mutations and evolution of p53 family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 1, p. 198–206, jan. 2014.

HUMPTON, T. J.; VOUSDEN, K. H. Regulation of Cellular Metabolism and Hypoxia by p53. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 7, p. a026146, 1 jul. 2016.

HUNGER, A. *et al.* Reestablishment of p53/Arf and interferon- β pathways mediated by a novel adenoviral vector potentiates antiviral response and immunogenic cell death. **Cell Death Discovery**, v. 3, p. 17017, 20 mar. 2017.

INVITROGEN. **pAd/CMV/V5-DEST™ and pAd/PL-DEST™ Gateway® Vectors User Guide**, 2012.

ISHII, N. *et al.* Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. **Brain Pathology**, v. 9, n. 3, p. 469–79, jul. 1999.

IWAKUMA, T.; CUI, Y.; CHANG, L.-J. Self-Inactivating Lentiviral Vectors with U3 and U5 Modifications. **Virology**, v. 261, n. 1, p. 120–132, ago. 1999.

IWASA, H.; HAN, J.; ISHIKAWA, F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. **Genes to Cells**, v. 8, n. 2, p. 131–144, fev. 2003.

JEYAPALAN, J. C. *et al.* Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, n. 1, p. 36–44, jan. 2007.

JOERGER, A. C.; ALLEN, M. D.; FERSHT, A. R. Crystal Structure of a Superstable Mutant of Human p53 Core Domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 2, p. 1291–1296, 9 jan. 2004.

JOERGER, A. C.; ANG, H. C.; FERSHT, A. R. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 41, p. 15056–15061, 10 out. 2006.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 6, p. a000919, 1 jun. 2010.

JONES, N.; SHENK, T. Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. **Cell**, v. 17, n. 3, p. 683–9, jul. 1979.

JUNTILA, M. R.; EVAN, G. I. P53 a Jack of all trades but master of none. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 11, p. 821–829, 2009.

KAESER, M. D.; IGGO, R. D. Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 1, p. 95–100, 8 jan. 2002.

KAMIYA-MATSUOKA, C.; GILBERT, M. R. Treating recurrent glioblastoma: an update. **CNS oncology**, v. 4, n. 2, p. 91–104, mar. 2015.

KANE, J. R. *et al.* Sui generis: gene therapy and delivery systems for the treatment of glioblastoma. **Neuro-oncology**, v. 17 Suppl 2, n. suppl 2, p. ii24–ii36, 1 mar. 2015.

KANFI, Y. *et al.* Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability. **FEBS Letters**, v. 582, n. 16, p. 2417–2423, 9 jul. 2008.

KANG, T.-W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. **Nature**, v. 479, n. 7374, p. 547–551, 9 nov. 2011.

KARMAKAR, S.; BANIK, N. L.; RAY, S. K. Curcumin suppressed anti-apoptotic signals and activated cysteine proteases for apoptosis in human malignant glioblastoma U87MG cells. **Neurochemical research**, v. 32, n. 12, p. 2103–13, 1 dez. 2007.

KEENAN, S. M.; LENTS, N. H.; BALDASSARE, J. J. Expression of Cyclin E Renders Cyclin D-CDK4 Dispensable for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein, Activation of E2F, and G 1-S Phase Progression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 7, p. 5387–5396, 13 fev. 2004.

KELKAR, S. A. *et al.* Cytoplasmic Dynein Mediates Adenovirus Binding to Microtubules. **Journal of Virology**, v. 78, n. 18, p. 10122–10132, 15 set. 2004.

KERR, J. F. R.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. **Cancer**, v. 73, n. 8, p. 2013–2026, 1994.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–57, ago. 1972.

KHAN, S. *et al.* p14ARF is a component of the p53 response following ionizing irradiation of normal human fibroblasts. **Oncogene**, v. 23, n. 36, p. 6040–6046, 14 ago. 2004.

KHLEIF, S. N. *et al.* Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 4350–4, 30 abr. 1996.

KIM, J.-S. *et al.* Proteomic and metabolomic analysis of H₂O₂-induced premature senescent human mesenchymal stem cells. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 6, p. 500–510, jun. 2011.

KIM, V. N. *et al.* Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 811–6, jan. 1998.

KING, G. D. *et al.* Gene therapy and targeted toxins for glioma. **Current gene therapy**, v. 5, n. 6, p. 535–57, dez. 2005.

KITAGAWA, M. *et al.* The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. **The EMBO journal**, v. 15, n. 24, p. 7060–9, 16 dez. 1996.

KITAYNER, M. *et al.* Structural Basis of DNA Recognition by p53 Tetramers. **Molecular Cell**, v. 22, n. 6, p. 741–753, 23 jun. 2006.

KNUDSON, A. G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 4, p. 820–823, 1 abr. 1971.

KNUDSON, A. G. Genetic predisposition to cancer. **Cancer detection and prevention**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 1984.

KO, A.; HAN, S. Y.; SONG, J. Dynamics of ARF regulation that control senescence and cancer. **BMB Reports**, v. 49, n. 11, p. 598–606, 30 nov. 2016.

KÖCK, H. *et al.* Adenovirus-mediated p53 gene transfer suppresses growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. **International journal of cancer**, v. 67, n. 6, p. 808–15, 17 set. 1996.

KORSMEYER, S. J. *et al.* Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. **Cell Death & Differentiation**, v. 7, n. 12, p. 1166–1173, 13 dez. 2000.

KOULGI, S. *et al.* QM-MM simulations on p53-DNA complex: a study of hot spot and rescue mutants. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 12, p. 5545–5559, 21 dez. 2013.

KOUTSOUDAKIS, G. *et al.* A *Gaussia* Luciferase Cell-Based System to Assess the Infection of Cell Culture- and Serum-Derived Hepatitis C Virus. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e53254, 31 dez. 2012.

KRAVCHENKO, J. E. *et al.* Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 17, p. 6302–6307, 29 abr. 2008.

KRISHNAMOORTHY, A.; WITKOWSKI, A.; RYAN, R. O. Nutlin-3a Nanodisks Induce p53 Stabilization and Apoptosis in a Subset of Cultured Glioblastoma Cells. **Journal of nanomedicine & nanotechnology**, v. 8, n. 4, ago. 2017.

KRIZHANOVSKY, V. *et al.* Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. **Cell**, v. 134, n. 4, p. 657–667, ago. 2008.

KRTOLICA, A. *et al.* Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 21, p. 12072–12077, 9 out. 2001.

KRUMSCHNABEL, G.; MANZL, C.; VILLUNGER, A. Caspase-2: killer, savior and safeguard—emerging versatile roles for an ill-defined caspase. **Oncogene**, v. 28, n. 35, p. 3093–3096, 6 set. 2009.

KRUSE, J.-P.; GU, W. Modes of p53 Regulation. **Cell**, v. 137, n. 4, p. 609–622, 15 maio 2009.

KUBBUTAT, M. H. G.; JONES, S. N.; VOUSDEN, K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 299–303, 15 maio 1997.

KUBOTA, H. *et al.* Identification of recurrent chromosomal rearrangements and the unique relationship between low-level amplification and translocation in glioblastoma. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 31, n. 2, p. 125–133, 2001.

KUILMAN, T.; PEEPER, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 2, p. 81–94, 9 fev. 2009.

KUMARI, R.; KOHLI, S.; DAS, S. p53 regulation upon genotoxic stress: intricacies and complexities. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 1, n. 3, p. e969653, 15 set. 2014.

LANE, D. P. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 15–16, 2 jul. 1992.

LANG, F. F. *et al.* Enhancement of radiosensitivity of wild-type p53 human glioma cells by adenovirus-mediated delivery of the p53 gene. **Journal of Neurosurgery**, v. 89, n. 1, p. 125–132, jul. 1998.

LEE, J. Y. *et al.* Development of a Dual-Luciferase Reporter System for In Vivo Visualization of MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Regulation. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 2, p. 285–294, 1 fev. 2008.

LEE, S. H. *et al.* Growth inhibitory effect on glioma cells of adenovirus-mediated p16/INK4a gene transfer in vitro and in vivo. **International journal of molecular medicine**, v. 6, n. 5, p. 559–63, 1 nov. 2000.

LEO, P. *et al.* Construction, production and characterization of pCLp16IRESp53 polycisronic retrovirus for combined cancer gene therapy. **Virus Reviews and Research**, v. 8, p. 219, 2003.

LEU, J. I.-J. *et al.* Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak–Mcl1 complex. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 443–450, 11 maio 2004.

LEVINE, A. J. P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323–331, 1997.

LEVINE, A. J.; OREN, M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749–758, 2009.

LI, G. *et al.* Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, n. 11–12, p. 731–741, nov. 2009.

LI, H. *et al.* Intracerebral adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy for experimental human glioma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 5, n. 3, p. 637–42, mar. 1999.

LI, J.; POI, M. J.; TSAI, M. D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16INK4A and their relevance to cancer. **Biochemistry**, v. 50, n. 25, p. 5566–5582, 28 jun. 2011.

LI, M. *et al.* Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. **Nature**, v. 416, n. 6881, p. 648–653, abr. 2002.

LI, M. Mono- Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2. **Science**, v. 302, n. 5652, p. 1972–1975, 12 dez. 2003.

LI, Y. *et al.* Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. **Cancer research**, v. 54, n. 23, p. 6078–82, 1 dez. 1994.

LINARES, L. K. *et al.* HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 21, p. 12009–12014, 14 out. 2003.

LINDSTRÖM, M. S.; WIMAN, K. G. Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts. **Oncogene**, v. 22, n. 32, p. 4993–5005, 6 ago. 2003.

LIU, B.; CHEN, Y.; ST. CLAIR, D. K. ROS and p53: A versatile partnership. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1529–1535, 15 abr. 2008.

LIU, D.-H. *et al.* Ginsenoside Rb1 Reverses H2O2-induced Senescence in Human Umbilical Endothelial Cells. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 222–230, mar. 2012.

LIU, D.; XU, Y. p53, Oxidative Stress, and Aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1669–1678, 15 set. 2011.

LIU, M. *et al.* Secreted *Gaussia* princeps Luciferase as a Reporter of Escherichia coli Replication in a Mouse Tissue Cage Model of Infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90382, 4 mar. 2014.

LIU, T. J. *et al.* Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus. **Cancer research**, v. 54, n. 14, p. 3662–7, 15 jul. 1994.

LLANOS, S. *et al.* Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. **Nature cell biology**, v. 3, n. 5, p. 445–52, 1 maio 2001.

LOHRUM, M. A. E. *et al.* C-Terminal Ubiquitination of p53 Contributes to Nuclear Export. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 24, p. 8521–8532, 15 dez. 2001.

LOUIS, D. N. *et al.* **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system** *Acta Neuropathologica*, 2007. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1929165/pdf/401_2007_Article_243.pdf>. Acesso em: 10 maio. 2017

LOUIS, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 9 jun. 2016.

LOWE, S. W.; SHERR, C. J. Tumor suppression by Ink4a–Arf: progress and puzzles. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, n. 1, p. 77–83, fev. 2003.

LU, Q.; TAN, Y.-H.; LUO, R. Molecular Dynamics Simulations of p53 DNA-Binding Domain. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 39, p. 11538–11545, 4 out. 2007.

LUBIN, D. J.; BUTLER, J. S.; LOH, S. N. Folding of Tetrameric p53: Oligomerization and Tumorigenic Mutations Induce Misfolding and Loss of Function. **Journal of Molecular Biology**, v. 395, n. 4, p. 705–716, 29 jan. 2010.

LUKAS, J. *et al.* Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 5, p. 2600–11, maio 1995.

LUNDBERG, A. S.; WEINBERG, R. A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 2, p. 753–61, fev. 1998a.

LUNDBERG, A. S.; WEINBERG, R. A. Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-cdk Complexes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 2, p. 753–761, 1 fev. 1998b.

LUO, J. *et al.* Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 8, p. 2259–2264, 24 fev. 2004.

LUSKY, M. *et al.* In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. **Journal of virology**, v. 72, n. 3, p. 2022–32, mar. 1998.

MA, B.; LEVINE, A. J. Probing potential binding modes of the p53 tetramer to DNA based on the symmetries encoded in p53 response elements. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7733–7747, dez. 2007.

MACHITANI, M. *et al.* NF- κ B promotes leaky expression of adenovirus genes in a replication- incompetent adenovirus vector. **Scientific Reports**, v. 6, n. August 2015, p. 1–12, 2016.

MACLEOD, K. F.; HU, Y.; JACKS, T. Loss of Rb activates both p53-dependent and independent cell death pathways in the developing mouse nervous system. **The EMBO journal**, v. 15, n. 22, p. 6178–88, 15 nov. 1996.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 3–15, 1995.

MALDONADO, J. L. *et al.* Mechanisms of Cell-Cycle Arrest in Spitz Nevi with Constitutive Activation of the MAP-Kinase Pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1783–1787, maio 2004.

MALIM, M. H. *et al.* The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. **Nature**, v. 338, n. 6212, p. 254–257, 16 mar. 1989.

MALLADI, S. *et al.* The Apaf-1•procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 13, p. 1916–1925, 8 jul. 2009.

MALUMBRES, M. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biology**, v. 15, n. 6, p. 122, 2014.

MARCHENKO, N. D.; MOLL, U. M. The Role of Ubiquitination in the Direct Mitochondrial Death Program of p53. **Cell Cycle**, v. 6, n. 14, p. 1718–1723, 15 jul. 2007.

MARCOTTE, R.; LACELLE, C.; WANG, E. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, n. 10–11, p. 777–783, out. 2004.

MARINE, J.-C.; JOCHEMSEN, A. G. Mdmx as an essential regulator of p53 activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 3, p. 750–760, jun. 2005.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Molecular cell**, v. 10, n. 2, p. 417–26, ago. 2002.

MATOBA, S. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1650–1653, 16 jun. 2006.

MATSUOKA, S. *et al.* p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. **Genes & Development**, v. 9, n. 6, p. 650–662, 15 mar. 1995.

MCCONNELL, M. J.; IMPERIALE, M. J. Biology of Adenovirus and Its Use as a Vector for Gene Therapy. **Human Gene Therapy**, v. 15, n. 11, p. 1022–1033, 2004.

MCDUFF, F. K. E.; TURNER, S. D. Jailbreak: Oncogene-induced senescence and its evasion. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 1, p. 6–13, 2011.

MCLENDON, R. *et al.* Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061–1068, 2008.

MEEK, D. W. Tumour suppression by p53: A role for the DNA damage response? **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 714–723, 2009.

MEHTA, I. S. *et al.* Alterations to Nuclear Architecture and Genome Behavior in Senescent Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, n. 1, p. 250–263, 1 abr. 2007.

MEIER, O. *et al.* Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. **The Journal of Cell Biology**, v. 158, n. 6, p. 1119–1131, 16 set. 2002.

MEULMEESTER, E. *et al.* Loss of HAUSP-Mediated Deubiquitination Contributes to DNA Damage-Induced Destabilization of Hdmx and Hdm2. **Molecular Cell**, v. 18, n. 5, p. 565–576, maio 2005a.

MEULMEESTER, E. *et al.* ATM-Mediated Phosphorylations Inhibit Mdmx/Mdm2 Stabilization by HAUSP in Favor of p53 Activation. **Cell Cycle**, v. 4, n. 9, p. 1166–1170, 22 set. 2005b.

MEUWISSEN, R. *et al.* Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. **Cancer cell**, v. 4, n. 3, p. 181–9, set. 2003.

MICHAEL, D.; OREN, M. The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. **Seminars in Cancer Biology**, v. 13, n. 1, p. 49–58, fev. 2003.

MICHALOGLOU, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 720–724, ago. 2005.

MIHARA, M. *et al.* p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, p. 577–590, mar. 2003.

MIYASHITA, T. *et al.* Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene**, v. 9, n. 6, p. 1799–805, jun. 1994.

MIYOSHI, H. *et al.* Development of a self-inactivating lentivirus vector. **Journal of virology**, v. 72, n. 10, p. 8150–7, out. 1998.

MOMAND, J.; ZAMBETTI, G. P. Mdm-2: “big brother” of p53. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 343–352, 1 mar. 1997.

MORLIGHEM, J.-É.; PETIT, C.; TZERTZINIS, G. Determination of silencing potency of synthetic and RNase III-generated siRNA using a secreted luciferase assay. **BioTechniques**, v. 42, n. 5, p. 599–606, maio 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUNAKATA, T. *et al.* Hepatitis C Virus Induces E6AP-Dependent Degradation of the Retinoblastoma Protein. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 9, p. e139, 7 set. 2007.

MUNOZ-PINEDO, C. *et al.* Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 31, p. 11573–11578, 1 ago. 2006.

MURRAY-ZMIJEWSKI, F.; SLEE, E. A.; LU, X. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 702–712, 1 set. 2008.

NAETAR, N. *et al.* PP2A-mediated regulation of ras signaling in G2 is essential for stable quiescence and normal G1 length. **Molecular Cell**, v. 54, n. 6, p. 932–945, 19 jun. 2014.

NAGAICH, A. K. *et al.* p53-induced DNA bending and twisting: p53 tetramer binds on the outer side of a DNA loop and increases DNA twisting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 5, p. 1875–1880, 2 mar. 1999.

NAKANO, K.; VOUSDEN, K. H. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. **Molecular Cell**, v. 7, n. 3, p. 683–694, mar. 2001.

NAKAZAWA, K.; DASHZEVEG, N.; YOSHIDA, K. Tumor suppressor p53 induces miR-1915 processing to inhibit Bcl-2 in the apoptotic response to DNA damage. **FEBS Journal**, v. 281, n. 13, p. 2937–2944, jul. 2014.

NAM, H. Y. *et al.* Prolonged autophagy by MTOR inhibitor leads radioresistant cancer cells into senescence. **Autophagy**, v. 9, n. 10, p. 1631–2, 25 out. 2013.

NARASIMHA, A. M. *et al.* Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. **eLife**, v. 3, n. 3, 4 jun. 2014.

NARITA, M. *et al.* Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 703–716, jun. 2003.

NARITA, M. *et al.* A Novel Role for High-Mobility Group A Proteins in Cellular Senescence and Heterochromatin Formation. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 503–514, ago. 2006.

NARITA, M. Cellular senescence and chromatin organisation. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 5, p. 686–691, 20 mar. 2007.

NARITA, M. *et al.* Spatial Coupling of mTOR and Autophagy Augments Secretory Phenotypes. **Science**, v. 332, n. 6032, p. 966–970, 20 maio 2011.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. a006049–a006049, 1 mar. 2012.

NIERS, J. M. *et al.* Multimodal In Vivo Imaging and Blood Monitoring of Intrinsic and Extrinsic Apoptosis. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 6, p. 1090–1096, jun. 2011.

NUTT, L. K. *et al.* Metabolic Regulation of Oocyte Cell Death through the CaMKII-Mediated Phosphorylation of Caspase-2. **Cell**, v. 123, n. 1, p. 89–103, out. 2005.

OBERST, A. *et al.* Inducible Dimerization and Inducible Cleavage Reveal a Requirement for Both Processes in Caspase-8 Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16632–16642, 28 maio 2010.

ODA, E. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. **Science**, v. 288, n. 5468, p. 1053–1058, 12 maio 2000.

OLIVIER, M. *et al.* The IARC TP53 database: New online mutation analysis and recommendations to users. **Human Mutation**, v. 19, n. 6, p. 607–614, jun. 2002.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 1, p. a001008, 1 jan. 2010.

OLOPADE, O. I. *et al.* Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas. **Cancer research**, v. 52, n. 9, p. 2523–9, 1 maio 1992.

OLTERSDORF, T. *et al.* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 677–681, 15 jun. 2005.

OSTROM, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro-oncology**, v. 16 Suppl 4, n. 1, p. iv1-63, out. 2014.

PAGE, K. A.; LANDAU, N. R.; LITTMAN, D. R. Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. **Journal of virology**, v. 64, n. 11, p. 5270–6, nov. 1990.

PAN, D. *et al.* Adenovirus mediated transfer of p53, GM-CSF and B7-1 suppresses growth and enhances immunogenicity of glioma cells. **Neurological research**, v. 32, n. 5, p. 502–9, 19 jun. 2010.

PAN, Y.; NUSSINOV, R. Structural Basis for p53 Binding-induced DNA Bending. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 1, p. 691–699, 5 jan. 2007.

PARRINELLO, S. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 3, p. 485–496, 18 jan. 2005.

PARRY, D. *et al.* Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. **The EMBO journal**, v. 14, n. 3, p. 503–11, 1 fev. 1995.

PASSOS, J. F.; SARETZKI, G.; VON ZGLINICKI, T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7505–7513, 26 nov. 2007.

PASSOS, J. F.; VON ZGLINICKI, T.; KIRKWOOD, T. B. L. Mitochondria and ageing: winning and losing in the numbers game. **BioEssays**, v. 29, n. 9, p. 908–917, set. 2007.

PAVLETICH, N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. **Journal of molecular biology**, v. 287, n. 5, p. 821–8, abr. 1999.

PEEPER, D. S.; BERNARDS, R. Communication between the extracellular environment, cytoplasmic signalling cascades and the nuclear cell-cycle machinery. **FEBS Letters**, v. 410, n. 1, p. 11–16, 23 jun. 1997.

PENG, Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. **Human gene therapy**, v. 16, n. 9, p. 1016–27, set. 2005.

PEREZ-ORDONEZ, B. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 5, p. 445–453, 16 fev. 2006.

PETITJEAN, A. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human Mutation**, v. 28, n. 6, p. 622–629, jun. 2007.

PIETTE, J.; NEEL, H.; MARÉCHAL, V. Mdm2: keeping p53 under control. **Oncogene**, v. 15, n. 9, p. 1001–1010, 1 ago. 1997.

POLYAK, K. *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. **Genes & Development**, v. 8, n. 1, p. 9–22, 1 jan. 1994a.

POLYAK, K. *et al.* Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. **Cell**, v. 78, n. 1, p. 59–66, jul. 1994b.

POLYAK, K. *et al.* A model for p53-induced apoptosis. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 300–305, 18 set. 1997.

POP, C. *et al.* Role of Proteolysis in Caspase-8 Activation and Stabilization †. **Biochemistry**, v. 46, n. 14, p. 4398–4407, abr. 2007.

POYUROVSKY, M. V. *et al.* The Mdm2 RING domain C-terminus is required for supramolecular assembly and ubiquitin ligase activity. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 1, p. 90–101, 10 jan. 2007.

PROST, S. *et al.* E2F regulates DDB2: consequences for DNA repair in Rb-deficient cells. **Oncogene**, v. 26, n. 24, p. 3572–3581, 18 maio 2007.

QUERIDO, E. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. **Genes & Development**, v. 15, n. 23, p. 3104–3117, 1 dez. 2001.

RAPER, S. E. *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. **Molecular genetics and metabolism**, v. 80, n. 1–2, p. 148–58, 2003.

RAUF, S. M. A. *et al.* The effect of R249S carcinogenic and H168R–R249S suppressor mutations on p53–DNA interaction, a multi scale computational study. **Computers in Biology and Medicine**, v. 40, n. 5, p. 498–508, maio 2010.

REMY, I.; MICHNICK, S. W. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on *Gaussia* luciferase. **Nature Methods**, v. 3, n. 12, p. 977–979, 12 dez. 2006.

RESSLER, S. *et al.* p16 INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. **Aging Cell**, v. 5, n. 5, p. 379–389, out. 2006.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–1461, nov. 2006.

RICCI, J.-E. *et al.* Disruption of Mitochondrial Function during Apoptosis Is Mediated by Caspase Cleavage of the p75 Subunit of Complex I of the Electron Transport Chain. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 773–786, jun. 2004.

RILEY, T. *et al.* Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 5, p. 402–412, 2008.

ROBLES, S. J.; ADAMI, G. R. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. **Oncogene**, v. 16, n. 9, p. 1113–1123, 10 mar. 1998.

ROCCO, J. W.; SIDRANSKY, D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. **Experimental Cell Research**, v. 264, n. 1, p. 42–55, mar. 2001.

ROTTER, V. p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 9, p. 2613–7, 1 maio 1983.

ROWE, W. P. *et al.* Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. **Experimental Biology and Medicine**, v. 84, n. 3, p. 570–573, 1 dez. 1953.

RUAS, M.; PETERS, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1378, n. 2, p. F115–F177, 14 out. 1998.

RUECKER, O. *et al.* *Gaussia*-luciferase as a sensitive reporter gene for monitoring promoter activity in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 280, n. 2, p. 153–62, 31 ago. 2008.

RUI, H.-B.; SU, J.-Z. Co-transfection of p16(INK4a) and p53 genes into the K562 cell line inhibits cell proliferation. **Haematologica**, v. 87, n. 2, p. 136–42, fev. 2002.

RUSSELL, W. C. *et al.* Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, n. 1, p. 59–72, 1 jul. 1977.

SAGE, J. *et al.* Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. **Nature**, v. 424, n. 6945, p. 223–8, 10 jul. 2003.

SAHA, T.; KAR, R. K.; SA, G. Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 117, n. 2–3, p. 250–263, 2015.

SAKUMA, T.; BARRY, M. A.; IKEDA, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 3, p. 603–618, 1 maio 2012.

SALVESEN, G. S.; RIEDL, S. J. Caspase mechanisms. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 615, p. 13–23, 2008.

SANCAR, A. *et al.* Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 39–85, 2004.

SANDIG, V. *et al.* Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. **Nature medicine**, v. 3, n. 3, p. 313–9, mar. 1997.

SANSONE, P. *et al.* IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 12, p. 3988–4002, 3 dez. 2007.

SAX, J. K. *et al.* BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 11, p. 842–849, 28 nov. 2002.

SCHAACK, J. *et al.* Adenovirus type 5 precursor terminal protein-expressing 293 and HeLa cell lines. **Journal of virology**, v. 69, n. 7, p. 4079–85, jul. 1995.

SCHRAML, E.; GRILLARI, J. From cellular senescence to age-associated diseases: the miRNA connection. **Longevity & Healthspan**, v. 1, n. 1, p. 10, 2012.

SERRANO, M. *et al.* Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. **Cell**, v. 88, n. 5, p. 593–602, 7 mar. 1997.

SERRANO, M.; BLASCO, M. A. Putting the stress on senescence. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 748–753, dez. 2001.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 704–707, 16 dez. 1993.

SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal Transduction in Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 4, p. a006098–a006098, 1 abr. 2015.

SHAPIRO, G. I. *et al.* p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 1, p. 378–87, jan. 1998.

SHERR, C. J. Principles of Tumor Suppression. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 235–246, jan. 2004.

SHERR, C. J. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 9, p. 663–673, 17 set. 2006.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. **Genes & Development**, v. 9, n. 10, p. 1149–1163, 15 maio 1995.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes & development**, v. 13, n. 12, p. 1501–12, 15 jun. 1999.

SHIBUE, T. Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. **Genes & Development**, v. 17, n. 18, p. 2233–2238, 15 set. 2003.

SHIMIZU, K. *et al.* Quantitative Analysis of the Leaky Expression of Adenovirus Genes in Cells Transduced with a Replication-Incompetent Adenovirus Vector. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 4, p. 1430–1435, ago. 2011.

SHIMIZU, K. *et al.* Suppression of leaky expression of adenovirus genes by insertion of microRNA-targeted sequences in the replication-incompetent adenovirus vector genome. **Molecular Therapy Methods & Clinical Development**, v. 1, n. April, p. 1–13, 2014.

SIKORA, E. *et al.* Impact of cellular senescence signature on ageing research. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 146–152, jan. 2011.

SITTE, N. *et al.* Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I—effects of proliferative senescence. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 15, p. 2495–2502, dez. 2000.

SLEE, E. A. *et al.* Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9-dependent Manner. **The Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 2, p. 281–292, 25 jan. 1999.

SMITH-VIKOS, T.; SLACK, F. J. MicroRNAs and their roles in aging. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 1, p. 7–17, 1 jan. 2012.

SMOLEWSKI, P. *et al.* Kinetics of HL-60 cell entry to apoptosis during treatment with TNF- α or camptothecin assayed by the stathmo-apoptosis method. **Cytometry**, v. 47, n. 3, p. 143–149, 2002.

SPENCER, S. L. *et al.* The Proliferation-Quiescence Decision Is Controlled by a Bifurcation in CDK2 Activity at Mitotic Exit. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 369–383, 10 out. 2013.

SPIERINGS, D. Connected to Death: The (Unexpurgated) Mitochondrial Pathway of Apoptosis. **Science**, v. 310, n. 5745, p. 66–67, 7 out. 2005.

STEIN, G. H. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. **Journal of cellular physiology**, v. 99, n. 1, p. 43–54, abr. 1979.

STEWART, P. L. Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 6, p. 1189–1198, 15 mar. 1997.

STOLBERG, S. G. The Biotech Death of Jesse Gelsinger. **N. Y. Times Magazine**, p. 136–150, nov. 1999.

STOMMEL, J. M.; WAHL, G. M. Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 7, p. 1547–1556, 7 abr. 2004.

STRACKER, T. H.; CARSON, C. T.; WEITZMAN, M. D. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11–Rad50–NBS1 DNA repair complex. **Nature**, v. 418, n. 6895, p. 348–352, 18 jul. 2002.

STRAUSS, B. E.; COSTANZI-STRAUSS, E. pCLPG: A p53-driven retroviral system. **Virology**, v. 321, n. 2, p. 165–172, 2004.

SYKES, S. M. *et al.* Acetylation of the DNA Binding Domain Regulates Transcription-independent Apoptosis by p53. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 30, p. 20197–20205, 24 jul. 2009.

SZAK, S. T.; MAYS, D.; PIETENPOL, J. A. Kinetics of p53 Binding to Promoter Sites In Vivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 10, p. 3375–3386, 15 maio 2001.

SZENT-GYORGYI, C. *et al.* **Cloning and characterization of new bioluminescent proteins**. (D. J. Bornhop, C. H. Contag, E. M. Sevick-Muraca, Eds.) SPIE 3600, Biomedical Imaging: Reporters, Dyes, and Instrumentation. **Anais...**1999Disponível em: <<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=976739>>

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 4 set. 2010.

TAKAI, H.; SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. **Current Biology**, v. 13, n. 17, p. 1549–1556, set. 2003.

TAKAOKA, M. *et al.* Ha-Ras G12V induces senescence in primary and immortalized human esophageal keratinocytes with p53 dysfunction. **Oncogene**, v. 23, n. 40, p. 6760–6768, 26 set. 2004.

TAM, S. W.; SHAY, J. W.; PAGANO, M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. **Cancer research**, v. 54, n. 22, p. 5816–20, 15 nov. 1994.

TANG, Y.; WELLS, J. A.; ARKIN, M. R. Structural and enzymatic insights into caspase-2 protein substrate recognition and catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 39, p. 34147–34154, 30 set. 2011.

TANNOUS, B. A. *et al.* Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 11, n. 3, p. 435–43, mar. 2005.

TANNOUS, B. A. *Gaussia* luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo. **Nature Protocols**, v. 4, n. 4, p. 582–591, abr. 2009.

TASDEMIR, E. *et al.* Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 6, p. 676–687, 4 jun. 2008.

TATSIS, N.; ERTL, H. C. J. Adenoviruses as vaccine vectors. **Molecular Therapy**, v. 10, n. 4, p. 616–629, out. 2004.

TÄUBER, B.; DOBNER, T. Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7847–54, 26 nov. 2001.

TERWILLIGER, E. F. *et al.* Construction and use of a replication-competent human immunodeficiency virus (HIV-1) that expresses the chloramphenicol acetyltransferase enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 10, p. 3857–3861, 1 maio 1989.

TOBIAS, A. *et al.* The art of gene therapy for glioma: a review of the challenging road to the bedside. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 84, n. 2, p. 213–222, fev. 2013.

TOMITA, Y. *et al.* WT p53, but Not Tumor-derived Mutants, Bind to Bcl2 via the DNA Binding Domain and Induce Mitochondrial Permeabilization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8600–8606, 31 mar. 2006.

TOSHIYUKI, M.; REED, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 293–299, jan. 1995.

TROTMAN, L. C. *et al.* Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 1092–1100, 1 dez. 2001.

TROY, C. M. *et al.* Nedd2 is required for apoptosis after trophic factor withdrawal, but not superoxide dismutase (SOD1) downregulation, in sympathetic neurons and PC12 cells. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 1911–8, 15 mar. 1997.

TROY, C. M. *et al.* Caspase-2 Mediates Neuronal Cell Death Induced by β -Amyloid. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 1386–1392, 15 fev. 2000.

TROY, C. M. *et al.* Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and -9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5007–16, 15 jul. 2001.

TSAI, K. Y. *et al.* Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. **Molecular cell**, v. 2, n. 3, p. 293–304, set. 1998.

TU, Z.; AIRD, K. M.; ZHANG, R. RAS, cellular senescence and transformation. **Small GTPases**, v. 3, n. 3, p. 163–167, 27 jul. 2012.

ULDRIJAN, S.; PANNEKOEK, W.-J.; VOUSDEN, K. H. An essential function of the extreme C-terminus of MDM2 can be provided by MDMX. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 1, p. 102–112, 10 jan. 2007.

VAN MEIR, E. G. *et al.* Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. **Cancer research**, v. 54, n. 3, p. 649–52, 1 fev. 1994.

VAN MEIR, E. G. *et al.* Single cell monitoring of growth arrest and morphological changes induced by transfer of wild-type p53 alleles to glioblastoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 4, p. 1008–1012, 14 fev. 1995.

VAN NGUYEN, T. *et al.* DNA damage-induced cellular senescence is sufficient to suppress tumorigenesis: a mouse model. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1453–1461, 11 jun. 2007.

VAUX, D. L.; KORSMEYER, S. J. Cell Death in Development. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 245–254, jan. 1999.

VENISNIK, K. M. *et al.* Fusion of *Gaussia* Luciferase to an Engineered Anti-carcinoembryonic Antigen (CEA) Antibody for In Vivo Optical Imaging. **Molecular Imaging and Biology**, v. 9, n. 5, p. 267–277, 15 ago. 2007.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307–310, 16 nov. 2000.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. P53 in Health and Disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 4, p. 275–283, 2007.

VOUSDEN, K. H.; RYAN, K. M. P53 and metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 691–700, 2009.

WALERYCH, D. *et al.* The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 11, p. 2007–2017, 1 nov. 2012.

WANG, B. *et al.* Expression of tumor suppressor genes p16, p21 and p53 in a pair of lung adenocarcinoma cell lines with different metastasis potentials: Anip973 and AGZY83-a. **Chinese journal of medical genetics**, v. 18, n. 2, p. 128–31, abr. 2001.

WANG, C. *et al.* DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. **Aging Cell**, v. 8, n. 3, p. 311–323, 26 maio 2009.

WARRILOW, D.; TACHEDJIAN, G.; HARRICH, D. Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together. **Reviews in Medical Virology**, v. 19, n. 6, p. 324–337, nov. 2009.

WEBER, J. D. *et al.* Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. **Nature Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 20–26, 1 maio 1999.

WEI, M. C. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. **Science**, v. 292, n. 5517, p. 727–730, 27 abr. 2001.

WELLEN, K. E.; THOMPSON, C. B. Cellular Metabolic Stress: Considering How Cells Respond to Nutrient Excess. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 323–332, out. 2010.

WEN, G. *et al.* The efficacy of p16, p53 and p21 genes on the proliferation of lung cancer cells in vitro. **Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases**, v. 22, n. 3, p. 169–72, mar. 1999.

WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S. History of gene therapy. **Gene**, v. 525, n. 2, p. 162–169, 2013.

WIRTH, T.; YLÄ-HERTTUALA, S. Gene Therapy Used in Cancer Treatment. **Biomedicines**, v. 2, n. 2, p. 149–162, 2014.

WURDINGER, T. *et al.* A secreted luciferase for ex vivo monitoring of in vivo processes. **Nature methods**, v. 5, n. 2, p. 171–3, 20 fev. 2008.

XANDE, J. *et al.* Sensor of caspase 3-dependent apoptosis and its application in the detection of adenovirus AdCDKN2AIRESp53 mediated cell death. In: International Symposium of American Society of Gene and Cell Therapy, 2013, Brasília. **Anais...Brasília**: 2013

XIA, L. *et al.* miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 2, p. 372–379, 15 jul. 2008.

XIONG, Y. *et al.* Alteration of cell cycle kinase complexes in human papillomavirus E6- and E7-expressing fibroblasts precedes neoplastic transformation. **Journal of virology**, v. 70, n. 2, p. 999–1008, fev. 1996.

XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. **Genes & Development**, v. 7, n. 8, p. 1572–1583, 1 ago. 1993.

XU, J. *et al.* Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 5, p. 285–295, 27 maio 2011.

XU, K. *et al.* miR-1915 inhibits Bcl-2 to modulate multidrug resistance by increasing drug-sensitivity in human colorectal carcinoma cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 52, n. 1, p. 70–78, jan. 2013.

XU, Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. **Cell death and differentiation**, v. 10, n. 4, p. 400–3, 28 abr. 2003.

XUE, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. **Nature**, v. 445, n. 7128, p. 656–660, 24 fev. 2007.

YANG, X. Clonogenic Assay. **Bio-Protocol**, v. 2, n. 10, 2012.

YANG, Y. *et al.* Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 10, p. 4407–4411, 10 maio 1994a.

YANG, Y. *et al.* Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. **Nature Genetics**, v. 7, n. 3, p. 362–369, 1 jul. 1994b.

YOUNG, A. R. J. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. **Genes & Development**, v. 23, n. 7, p. 798–803, 1 abr. 2009.

YU, X. *et al.* A Structure of the Human Apoptosome at 12.8 Å Resolution Provides Insights into This Cell Death Platform. **Structure**, v. 13, n. 11, p. 1725–1735, nov. 2005.

YUAN, J.; KROEMER, G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. **Genes & Development**, v. 24, n. 23, p. 2592–2602, 1 dez. 2010.

ZACHE, N. *et al.* PRIMA-1MET inhibits growth of mouse tumors carrying mutant p53. **Cellular oncology: the official journal of the International Society for Cellular Oncology**, v. 30, n. 5, p. 411–8, 2008.

ZANATTA, D. B. *et al.* Genetic barcode sequencing for screening altered population dynamics of hematopoietic stem cells transduced with lentivirus. **Molecular Therapy. Methods & Clinical Development**, v. 1, p. 14052, 2014.

ZAMANIAN, M.; LA THANGUE, N. B. Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from repressing the activity of a cellular transcription factor. **The EMBO journal**, v. 11, n. 7, p. 2603–10, jul. 1992.

ZHANG, B. *et al.* The p16-specific reactivation and inhibition of cell migration through demethylation of CpG islands by engineered transcription factors. **Human gene therapy**, v. 23, n. 10, p. 1071–81, out. 2012.

ZHANG, W. W. *et al.* High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. **Cancer gene therapy**, v. 1, n. 1, p. 5–13, mar. 1994.

ZHANG, Y. *et al.* Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, n. 2, p. 213–221, fev. 2007.

ZHAO, R. *et al.* **Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16INK4a) in CancerEBioMedicine**, jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4919535/pdf/main.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2018

ZHU, J. *et al.* Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. **Genes & Development**, v. 12, n. 19, p. 2997–3007, 1 out. 1998.

ZHU, W. *et al.* miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 11, p. 2520–2529, 16 fev. 2010.

ZHU, W. *et al.* miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 723–731, 13 mar. 2012.

ZHU, Z. *et al.* Adenovirus-mediated transfer of p53 and p16 inhibiting proliferating activity of human bladder cancer cell EJin vitro andin vivo. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v. 22, n. 4, p. 324–326, dez. 2002.

ZINDY, F. *et al.* Expression of INK4 Inhibitors of Cyclin during Mouse Brain Development1 Kinases. **Cell Growth &Differentiation**, v. 8, n. November, p. 1139–1150, 1997.

ZOU, H. *et al.* Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. elegans CED-4, Participates in Cytochrome c–Dependent Activation of Caspase-3. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 405–413, ago. 1997.

ZUFFEREY, R. *et al.* Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 15, n. 9, p. 871–875, 1 set. 1997.

ZUFFEREY, R. *et al.* Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. **Journal of virology**, v. 72, n. 12, p. 9873–80, dez. 1998.