KÁTIA SEIDENBERGER

**Construção e avaliação da ação de plasmídeo contendo
gene suicida timidina quinase e gene imunomodulador
da interleucina 12 otimizada, visando terapia gênica
para carcinoma medular de tireóide**

**Tese a ser apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Rosalinda Yossie Asato de Camargo

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Medeiros-Neto

São Paulo

2007

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
I. RESUMO.....	4
II. ABSTRACT.....	6
III. INTRODUÇÃO	8
III.1- CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE	
III.2- TERAPIA GÊNICA	
III.3- INTERLEUCINA 12	
III.4- IMUNOVIGILÂNCIA E IMUNOTERAPIA	
III.5- ESPECIFICIDADE	
III.6- A ESCOLHA DOS GENES TERAPÊUTICOS	
TIMIDINA QUINASE E INTERLEUCINA 12 OTIMIZADA	
III.7- A ESCOLHA DO PROMOTOR	
IV. OBJETIVOS	48
V. MATERIAIS E MÉTODOS	49
V.1- LINHAGENS E PLASMÍDIOS	
V.2- MEIOS DE CULTURA	
V.3- SOLUÇÕES	
V.4- TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS	
V.5- EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO	
V.6- TRATAMENTO DO DNA COM:	
• ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	
• ENZIMA KLENOW	
• LIGASE (REAÇÃO DE LIGAÇÃO)	
V.7- PURIFICAÇÃO DE DNA	
V.8- ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA EM GEL DE AGAROSE	
V.9- ELUIÇÃO DE DNA DO GEL DE AGAROSE	
V.10- AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS – PCR	
V.11- CLONAGEM DE FRAGMENTO DE PCR	
V.12- SEQÜENCIAMENTO	
V.13- CLONAGENS: CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIOS	
V.14- TRANSFEÇÃO DE CULTURA DE CÉLULAS	
V.15- AVALIAÇÃO DA LUCIFERASE	
V.16- ENSAIOS COM LINFÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS	
V.17- AVALIAÇÃO DE APOPTOSE	
VI. RESULTADOS.....	69
VII. DISCUSSÃO.....	80
VIII. CONCLUSÕES.....	89
IX. APÊNDICE.....	90
X. ANEXO.....	102
XI. BIBLIOGRAFIA	106

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad	adenovírus
DC	células dendríticas
Células HEK 293	células embionárias renais humanas
Células TT	células humanas de carcinoma medular de tireóide
CMT	Carcinoma Medular de Tireóide
CT	Calcitonina
GCV	Ganciclovir
HSV-tk	Herpes simplex virus thymidine kinase
(h)IL-12	Interleucina 12 (humana)
(m)IL-12	Interleucina 12 (murina)
(ev)IL-12	Interleucina 12 (“evolved”=otimizada)
Luc	Luciferase (marcador)
TCP	Promotor da calcitonina modificado
Vetor pTCPevIL12tk	Plasmídio expressando os genes evIL-12 e HSV-tk, sob controle do promotor TCP
Vetor pTCPLuc	Plasmídio expressando a luciferase, sob controle do promotor TCP

I. RESUMO

Seidenberger,K. Construção e avaliação da ação de plasmídeo contendo gene suicida timidina quinase e gene imunomodulador da interleucina 12 otimizada, visando terapia gênica para carcinoma medular de tireóide [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Os tratamentos convencionais para carcinoma medular de tireóide (CMT) metastático são insatisfatórios. Tanto a quimioterapia quanto a radioterapia são pouco eficazes para a doença avançada. Portanto, a terapia gênica é uma promissora opção. Trabalhos de construção de vetores plasmidiais ou adenovirais específicos para cultura de células de carcinoma medular de tireóide e/ou animais têm demonstrado resultados encorajadores, conseguindo significativa redução do tumor. O objetivo deste trabalho foi construir e avaliar a eficácia do plasmídeo pTCPtkevIL-12 contendo o gene da timidina quinase (HSV-tk) e da interleucina 12 otimizada/evolved (evIL-12), ambos sob controle do promotor da calcitonina modificado (TCP), visando terapia gênica do CMT. A associação entre um gene “suicida” (TK) e um gene imunomodulador (IL12) é sabidamente sinérgica, o que motivou o emprego destes dois genes no vetor terapêutico. Por melhoramento genético, obteve-se recentemente a IL-12 otimizada/evolved, com elevada capacidade em induzir resposta imune. O promotor TCP é mais forte e mais específico que o promotor de calcitonina natural, e já foi usado em diversos trabalhos em CMT. Para determinar a atividade biológica das interleucinas 12 (evIL-12 e mL-12), os sobrenadantes das culturas de células TT transfectadas foram utilizados para avaliar proliferação linfocitária e estimulação de células dendríticas (DCs). As células TT (carcinoma medular humano de tireóide) foram transfectadas com o plasmídeo pTCPtkevIL-12 ou pTCPmIL-12 (plasmídeo com o gene da IL-12 murina, sob controle do promotor TCP). A proliferação linfocitária foi quantificada por citometria de fluxo e a diferenciação de linfócitos T para um padrão Th1 foi verificada através da dosagem de IFN- γ e IL-4 por ELISA. A avaliação do perfil fenotípico das DCs, cultivadas com sobrenadante contendo mL-12 ou evIL-12 durante a diferenciação, foi feita através de marcação com anticorpos das moléculas de membrana marcadoras de maturação CD80, CD83, CD86 e CD40, com leitura também por citometria de fluxo. Também foi avaliada e comprovada a capacidade do plasmídeo pTCPevIL-12 de promover apoptose induzida pelo sistema suicida timidina quinase/ganciclovir, nas células TT transfectadas. Os experimentos de proliferação linfocitária verificaram que ambas IL-12 promoveram intensa proliferação linfocitária, em similar magnitude. A principal função da IL12, todavia, não é estimular proliferação linfocitária, mas sim, induzir fortemente diferenciação para Th1, fundamental para uma eficiente resposta anti-tumoral. Foi observado que ambas IL-12 proporcionaram forte resposta Th1. Porém, a evIL-12 mostrou-se superior à mL-12 na diferenciação dos linfócitos T para o padrão Th1. Os experimentos que avaliaram a capacidade da IL-12 maturar DCs diferenciadas, mostraram um aumento na expressão de CD40 nas DCs sob estímulo de ambas IL-12, porém a expressão foi discretamente maior com evIL-12 que com mL-12. Não foi observada alteração na expressão das outras proteínas marcadoras de maturação (CD80, CD83, CD86). Comparando-se o sobrenadante das células TT transfectadas com o plasmídeo pTCPtkevIL-12 antes e após adição de GCV, verificou-se que ele se tornou mais eficiente para induzir expressão de CD40 nas células dendríticas após a adição do GCV. O incremento de expressão de CD40 nas DCs após tratamento com GCV poderia explicar, ao menos em parte, o efeito anti-tumoral sinérgico observado com a expressão simultânea dos genes timidina quinase e IL-12, já descritos em estudos *in vivo*, na literatura. Considerando-se que a evIL-12 mostrou-se mais eficiente em promover diferenciação dos linfócitos T para padrão Th1 e em promover uma maturação/ativação de melhor qualidade das células

dendríticas diferenciadas (maior expressão de CD40), poderia-se afirmar que esta IL-12 é extremamente imunogênica, superior inclusive à IL-12 murina, a única utilizada até o momento em terapia gênica de CMT. Os resultados satisfatórios alcançados neste trabalho oferecem perspectivas de aplicação futura ao plasmídeo terapêutico pTCPtkevlL-12 para uso em terapia gênica em CMT. O plasmídeo poderia ser utilizado em aplicação intra-tumoral e em estimulação de células dendríticas. A vacinoterapia com células dendríticas estimuladas com sobrenadante de células TT transfectadas com pTCPtkevlL-12 e tratadas com ganciclovir, devido a elevada expressão de CD40, pode ser uma esperança de um tratamento mais eficaz das metástases do CMT. Diversos estudos afirmam haver uma correlação direta entre maior expressão de CD40 e maior regressão do tumor primário e das metástases.

Descritores: 1. Plasmídeos; 2. Timidina Quinase; 3. Interleucina-12; 4. Terapia de Genes; 5. Carcinoma Medular.

II. ABSTRACT

Seidenberger,K. Construction and Evaluation of Plasmid Expressing Thymidine Kinase Suicide Gene and Immunomodulatory Evolved Interleukin-12 Gene for Medullary Thyroid Carcinoma Gene Therapy [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Present treatments of advanced and metastatic medullary thyroid carcinoma (MTC) are unsatisfactory. Tissue-specific cancer gene therapy is a promising alternative approach. IL-12 gene is a good cytokine to be used in gene therapy because it appears to be the most effective immunomodulatory gene. Literature data shows synergism in the association of two antitumor methods: suicide gene thymidine kinase (HSV-tk) and interleukin genes; therefore, they should ideally be together in the vector. The evolved interleukin12, obtained by DNA shuffling, is believed to elicit more antitumoral immune response than the human IL-12. None of them has been tested in MTC, only the murine IL-12 has been employed in MTC gene therapy.

To explore a more efficient multi-gene antitumor treatment, development and evaluation of a plasmid expressing both herpes simplex virus thymidine kinase type 1 (HSVtk) and evolved interleukin-12 (evIL-12) under the control of modified calcitonin promoter (TCP) were done in this study. TCP promoter is more specific and efficient than the natural calcitonin promoter CT/CGRP, and has already been used in several studies. To verify IL-12 biological activity, lymphocyte proliferation and dendritic cell stimulation after IL-12 were studied. TT cells (human MTC) were transfected by pTCPtkevIL-12 plasmid or by pTCPmIL-12 (plasmid containing murine IL-12 gene, under control of TCP promoter). Lymphocyte proliferation was analysed by flow cytometry, and Th1 response was assessed by IFN- γ and IL-4 ELISA measurement. The phenotypic analysis of dendritic cells (DCs) by flow cytometry was based on the expression of the maturative surface markers CD80, CD83, CD86 and CD40. Also, plasmid pTCPtkevIL-12 ability to promote TT transfected cells apoptosis, through the suicide system HSV-tk/ganciclovir, was evaluated and confirmed. Both IL-12 elicited similar intense lymphocyte proliferation. Nevertheless, the main IL-12 function is not to stimulate lymphocyte proliferation but induce Th1 immune response, which is essential for efficient anti-tumour response. Both IL-12, showed great Th1 response; however fortunately, ev-IL12 was superior to mIL-12 in promoting T cell Th1 response. Flow cytometry analysis of DCs revealed significant higher expression of CD40 surface molecule after differentiated DCs were exposed to TT transfected cells, either with pTCPtkevIL-12 or pTCPmIL-12, supernatants. DCs stimulated with supernatants containing evIL-12 were 36.91% CD40+, whereas when stimulated by supernatants containing mIL-12 were 14.74% CD40+. The other maturative markers (CD80, CD83, CD86) remained with the same expression level. Moreover, TT pTCPtkevIL-12-transfected cells supernatants, showed a even higher ability of increasing CD40 expression in DCs after treatment with GCV. At least partially, this increase in dendritic cells CD40 expression could explain the synergism observed with the simultaneous expression of thymidine kinase and interleukin genes. Outstanding lymphocyte proliferation and dendritic cell stimulation were achieved by the evIL-12 secreted in the supernatants, confirming that this interleukin 12 is really very potent. The good results achieved by the present study justify further experiments with this therapeutic plasmid. It could be used intra-tumorally and to stimulate/mature dendritic cells. Vaccine with DCs stimulated by TT pTCPtkevIL-12-transfected cells after GCV treatment supernatants, due to higher CD40 expression, could be very suitable for the treatment of MTC metastasis. Several studies show better primary tumor and metastasis regression in the presence of high levels of CD40 expression.

Descriptors: 1. Plasmids; 2. Thymidine Kinase; 3. Interleukin-12; 4. Gene Therapy; 5. Medullary Carcinoma.

III. INTRODUÇÃO

III.1. CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE

III.1A. EPIDEMIOLOGIA

O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina maligna mais freqüente. Apesar disso, ele representa apenas 1% de todos os cânceres no mundo em humanos (Smalley et al, 2006). Os carcinomas tireoidianos são classificados em diferenciados (papilífero e folicular), anaplásico e medular.

A incidência do câncer de tireóide aumentou de 3,6/100.000 em 1973 para 8,7/100.000 em 2002 nos E.U.A. Não houve um aumento na incidência dos tipos histológicos folicular, anaplásico e medular; mas, a incidência do carcinoma papilífero quase triplicou neste período. Os carcinomas papilíferos menores que 2 cm responderam por 87% deste aumento. Como os carcinomas papilíferos representam mais de 80% dos casos de carcinoma tireoidiano (Hundahl et al, 2000) e possuem bom prognóstico (o melhor entre todos os tipos histológicos), a mortalidade por câncer de tireóide de 0,5 óbitos/100.000 pessoas por ano manteve-se estável nos E.U.A. nesse período de 1998-2002 (Davies et al, 2006). A estimativa para 2007, nos E.U.A. é de que 33.550 novos casos sejam diagnosticados e que ocorram 1.530 mortes relacionadas a câncer de tireóide (National Cancer Institute; www.cancer.gov).

Dados do Brasil apontam uma incidência e mortalidade por câncer de tireóide compatíveis com os descritos pela literatura mundial. No período de 1980 a 1999, houve um decréscimo nas taxas de mortalidade, que pode estar relacionado à melhoria do diagnóstico e tratamento precoce do câncer tireoidiano (Coeli et al, 2005).

O Carcinoma Medular de Tireóide (CMT) representa 5 a 10% dos cânceres de tireóide (Hundahl et al, 1998). Aproximadamente 25% são hereditários e causados por mutação ativadora do proto-oncogene RET nas células germinativas, levando a uma herança autossômica dominante. Na forma esporádica que representa 75-80% dos casos, a idade média de apresentação é por volta de 50 anos de idade, com discreto predomínio do

sexo feminino (DeLellis et al, 2004 - WHO). O comportamento biológico do CMT é bastante variável, porém, seu grau de agressividade geralmente é maior que o dos carcinomas bem diferenciados e é responsável por uma significativa mortalidade (Magalhães et al, 2003; Messina et al 2007).

A sobrevida de 10 anos de pacientes americanos com CMT (53.856 casos do National Cancer Data Base dos Estados Unidos de 1985 a 1995) foi de 75%, contra 93, 85, 76 e 14% de pacientes com carcinoma papilífero, folicular, de células de Hürthle e indiferenciado, respectivamente (Hundahl et al, 1998). A sobrevida de 76% em 10 anos de um estudo que analisou 1217 pacientes com CMT de 53 centros alemães foi bem similar (Raue et al, 1998). DeLellis et al, em 2004, mostrou uma sobrevivência global de 95% para os carcinomas papilíferos, de 77% em 10 anos para carcinomas foliculares, de 85% em 10 anos para carcinomas medulares com linfonodos negativos, porém, de apenas 40% para aqueles que apresentavam comprometimento ganglionar.

III.1B. PATOLOGIA, QUADRO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO

O Carcinoma Medular de Tireóide (CMT) desenvolve-se a partir das células parafoliculares (células C) da tireóide. Estas células são de origem neuroendócrina, provenientes da crista neural, sendo bastante diversas das células foliculares tireoidianas. Elas ficam dispersas no tecido tireoidiano com um predomínio nos terços médios dos lobos tireoidianos e representam apenas 1% da massa desta glândula (Gharib et al, 1998). As células C secretam calcitonina, o marcador tumoral do CMT, além de outras substâncias: CEA (antígeno carcinoembrionário), CGRP (peptídio relacionado ao gene da calcitonina), amilóide, somatostatina, CRH (corticotropina), ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), VIP (peptídio intestinal vasoativo), cromogranina, histamina, serotonina, substância P, prostaglandinas, histaminas, entre outros (Gharib et al, 1998; Orlandi et al, 2001).

O CMT foi reconhecido como uma entidade clínico-patológica distinta em 1959, por Hazard e cols e, posteriormente, formas hereditárias deste tumor foram descritas (Magalhães et al, 2003). Macroscopicamente, os tumores são firmes, bem circunscritos mas não encapsulados. O tamanho varia desde

“microcarcinomas” menores que 1 cm de diâmetro a vários centímetros. Os esporádicos são tipicamente unilaterais enquanto os familiares são caracteristicamente múltiplos e bilaterais.

O CMT tende a originar metástases precocemente, particularmente para linfonodos cervicais. Metástases à distância são encontradas em aproximadamente 20% dos pacientes que apresentam nódulos palpáveis, freqüentemente para fígado, pulmões e ossos e ocasionalmente para cérebro e tecidos moles. Metástases à distância ocultas são a maior causa de hipercalcitoninemia persistente após tireoidectomia e dissecação de linfonodos cervicais (DeLellis et al, 2004).

A calcitonina apresenta importante papel no diagnóstico e seguimento de pacientes com CMT e a sua secreção é estimulada pela pentagastrina e/ou cálcio (testes provocativos) (Ezabella et al, 1990a-1990b; Hauache et al, 2003). O CEA também é utilizado no acompanhamento dos pacientes com CMT, auxiliando a avaliar a atividade tumoral.

O CMT também pode ser diagnosticado citologicamente, através de punção aspirativa por agulha fina do nódulo tiroidiano. Os aspirados são tipicamente hipercelulares e sem coesão. As células podem se apresentar poligonais, fusiformes ou plasmocitóides com núcleos hipercromáticos, cromatina irregularmente distribuída e moderado grau de pleomorfismo. A presença de amilóide pode ser encontrada em até 50-70% dos aspirados (DeLellis et al, 2004). A imunocitoquímica para calcitonina que pode ser realizada no material citológico tende a aumentar a acurácia diagnóstica (Gharib et al, 1998).

O aspecto histopatológico do CMT é variável podendo apresentar ninhos de células poligonais, arredondadas ou fusiformes separadas por estroma fibrovascular dando origem a arranjos trabeculares de tamanhos e configurações variadas. Os núcleos são redondos ou ovalados apresentando cromatina irregularmente distribuída e nucléolos não proeminentes (com exceção da variante oncocítica) (DeLellis et al, 2004).

As células tumorais são imunorreativas para calcitonina na grande maioria dos casos. O CEA é expresso na maioria dos tumores e as células

tumorais são positivas para uma variedade de marcadores neuroendócrinos como cromogranina A e sinaptofisina (Uribe et al, 1985).

A investigação inicial por imagem deve ser feita através da ultrasonografia cervical que, apesar de ser inespecífica para o diagnóstico etiológico do nódulo tireoidiano, pode detectar nódulos suspeitos de até 2 mm de diâmetro, auxiliar na detecção de metástases ganglionares não palpáveis e mostrar características ultra-sonográficas sugestivas de benignidade ou malignidade (Camargo & Tomimori, 1998). Nos pacientes com massas ou nódulos volumosos e naqueles com suspeita de metástases mediastinais, os estudos de imagem pela tomografia computadorizada ou pela ressonância magnética são muito úteis para o planejamento terapêutico. Como o CMT capta metaiodobenzilguanidina (^{131}I -MIBG), a cintilografia com esta substância pode ser usada também na procura de metástases em pesquisa de corpo inteiro (PCI), embora apresente sensibilidade baixa (em torno de 30-40%). A PCI também pode ser realizada com octreoscan (^{111}In -pentetreotide), VDMSA ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pentadimercapto succínico), $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrafosmin e ^{201}Tl . A PCI com VDMSA parece mostrar melhor sensibilidade diagnóstica (80-85%), sendo considerada por alguns autores como o exame nuclear de escolha para o manejo de pacientes com CMT (Magalhães et al, 2003).

A apresentação clínica do CMT pode se dar de diversas formas. Usualmente, o paciente apresenta uma ou mais nodulações cervicais, porém, podem ocorrer queixas relacionadas à invasão local pelo tumor (disfagia, estridor, rouquidão, dispnéia) e/ou à síndrome paraneoplásica, devido à secreção hormonal pelas células tumorais (rubor facial, diarreia, dor óssea, síndrome de Cushing). Muitas vezes, o CMT pode se apresentar apenas com metástases ganglionares cervicais, sem que ainda haja nódulo tireoidiano palpável. Manifestações específicas dos outros componentes da Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2 como feocromocitoma e hiperparatireoidismo podem preceder, ocorrer simultaneamente ou, mais comumente, ocorrer posteriormente ao CMT (Magalhães et al, 2003).

A história natural do CMT é bem variável, da rápida progressão tumoral com sobrevida que varia de poucos anos a uma progressão muito lenta ou doença estável por décadas. Os fatores prognósticos adotados pelo European

Organization for Research and Treatment of Câncer (EORTEC): idade, sexo, tipo e estadio do tumor são os de maior valor preditivo (Kebebow et al, 2000). Barbet et al, em 2005, concluíram que o tempo necessário para dobrar o nível sérico de calcitonina é fator prognóstico independente de sobrevida.

Saber a qual grupo de risco pertence o paciente com CMT pode auxiliar na decisão em adotar uma conduta conservadora ou agressiva para localização do(s) foco(s) tumoral(is) que não estão sendo encontrados pelas técnicas convencionais diagnósticas de CMT, especialmente no grupo de pacientes com CMT oculto. Na conduta conservadora, vai-se repetindo periodicamente os métodos diagnósticos convencionais para o CMT até se encontrar o foco. Na agressiva, técnicas diagnósticas invasivas podem ser empregadas: dissecação cervical, dissecação do mediastino superior (Molley et al, 1993; Tissel et al, 1996), cateterização da veia cava superior e jugulares internas para coleta seriada de calcitonina durante teste de estímulo com pentagastrina (Frank-Raue et al, 1992) e exploração hepática laparoscópica.

III.1C. CLASSIFICAÇÃO DO CARCINOMA MEDULAR DE TIREÓIDE

Dentre os carcinomas medulares de tireóide, 75-80% são esporádicos e 25% são familiares. Os CMT familiares/hereditários podem fazer parte de três síndromes distintas: Neoplasia Endócrina Múltipla (Tipo 2A ou 2B) ou CMT Familiar (CMTF). A NEM 2A é a síndrome familiar mais freqüente (~90%) e consiste de CMT, feocromocitoma bilateral em 50% dos casos e hiperparatiroidismo em 10 a 20% dos pacientes; a NEM 2B (~5%) é caracterizada por CMT, feocromocitoma bilateral em 20-50% dos casos e aspecto fenotípico marfanóide típico com ganglioneuromatose. CMT familiar (não NEM) é uma outra manifestação de CMT hereditário, com o carcinoma de tireóide como única manifestação (Tabela 1) (modificada de Gharib et al, 1998; de Groot JWB et al, 2006).

Tabela 1. Classificação do Carcinoma Medular de Tireóide

	Fenótipos (%)			
	CMTF	NEM 2A	NEM 2B	Esporádico
HCC	100	100	100	0
CMT-M	100	100	100	0
CMT-F	0	0	0	100
Endocrinopatias associadas (%)				
FEO	-	10-50	10-50	-
HPT	-	10-20	-	-
Patologias associadas (%)				
Líquen amilóide cutâneo	-	<10	-	-
HSCR	-	Raro	-	-
Hábito marfanóide	-	-	100	-
Ganglioneuromatose intestinal	-	-	60-90	-
Neuromas mucosos	-	-	70-100	-
Nervos corneanos espessados	-	raro	60-90	-
Idade de início (anos)	<20 a >50	<20	<10	40-60

Abreviações: CMT (carcinoma medular de tireóide); CMTF (CMT familiar); NEM (Neoplasia Endócrina Múltipla); HCC (hiperplasia de células C); CMT-M (CMT multicêntrico); CMT-F (CMT focal); FEO (feocromocitoma); HPT (hiperparatiroidismo); HSCR (Doença de Hirschsprung = aganglioneurose colônica).

Em aproximadamente 5% dos pacientes com CMT presumidamente “esporádicos”, nota-se que eles são multicêntricos e familiares. É consenso que, para tratamento adequado de CMT, a tireoidectomia deve ser total (Gharib et al, 1998). Especialmente nos casos familiares de CMT, o diagnóstico também pode ser feito através de rastreamento genético.

III.1D. PROTO-ONCOGENE *RET*

Os carcinomas medulares de tireóide familiares (NEM2A, NEM2B, CMTF) são de herança autossômica dominante ligada ao cromossomo 10. Ocorrem mutações germinativas no proto-oncogene *RET*, envolvidas na carcinogênese dos CMT familiares. Mutações somáticas no proto-oncogene *RET* foram encontradas em CMT esporádicos e podem ser marcadores úteis para doenças não hereditárias (Orlandi et al, 2001). As mutações do *RET* estão presentes em 95% dos CMT familiares e em até 70% dos esporádicos (Gimm et al, 2001).

O gene *RET* localiza-se no cromossomo 10q11.2, apresenta 21 exons e codifica um receptor tirosina quinase, com os domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático (Silva et al, 2003). Mutações ativadoras no *RET* são causa de desenvolvimento de CMT pois há ativação do receptor,

independente de um ligante, resultando em atividade constitutiva da tirosina quinase. Desde a descoberta que mutações no gene *RET* são responsáveis pelo desenvolvimento de CMT, adota-se cada vez mais a busca genética (“screening”) de carreadores de mutação (Drosten M & Pützer BM, 2003). O genótipo do *RET* é importante guia na conduta terapêutica dos pacientes com CMT familiares (Tabela 2 – modificada de de Groot JWB et al, 2006).

Tabela 2. Conduta nas Neoplasias Endócrinas Múltiplas Tipo 2 e CMT Familiar de acordo com o genótipo do proto-oncogene *RET*

Categoria do Risco	Códon RET	Menor idade de CMT diagnosticado	Idade recomendada para cirurgia (anos)
Altíssima (3)	883	Não descrita	<1
Altíssima (3)	918*	9 meses	<1
Alta (2)	609	5 anos	<5
Alta (2)	611	7 anos	<5
Alta (2)	618	7 anos	<5
Alta (2)	620	6 anos	<5
Alta (2)	630	12 meses	<2
Alta (2)	634 **	13 meses	<2
Alta (2)	912	14 anos	<5
Menos alta (1)	533	21 anos	5-10
Menos alta (1)	649	44 anos	5-10
Menos alta (1)	666	35 anos	5-10
Menos alta (1)	768	22 anos	5-10
Menos alta (1)	790	10 anos	5-10
Menos alta (1)	791	21 anos	5-10
Menos alta (1)	804	6 anos	5-10
Menos alta (1)	891	13 anos	5-10

* 95% dos casos NEM 2B têm mutação germinativa no códon 918

30% dos CMT esporádicos têm mutação somática no códon 918
(Gharib et al, 1998; Puñales et al, 2004)

** 87% dos casos NEM 2A possuem mutação germinativas no códon 634

Mutações descritas na NEM 2A e CMTF: códons 609, 611, 618, 620, 630, 634.
(Magalhães PKR et al, 2003; www.thyroidmanager.org/Chapter18).

Como existe uma forte correlação entre o genótipo do RET e o fenótipo, a detecção e a distinção entre as diferentes mutações no *RET* adquiriu grande impacto no tratamento precoce do CMT e NEM2 (Toledo et al, 2006).

A eficiência do rastreamento genético pela pesquisa de mutações no proto-oncogene *RET* está bem estabelecida no diagnóstico e na identificação de portadores assintomáticos das formas hereditárias de CMT, possibilitando aconselhamento genético e uma intervenção cirúrgica precoce e efetiva (tabela

2), reduzindo a morbidade e a mortalidade associadas a esta doença (Magalhães et al, 2003).

Há diversos estudos na literatura mostrando que uma mesma mutação do proto-oncogene *RET* pode apresentar uma ampla variabilidade clínica e agressividade tumoral (Feldman et al, 2000; Machens et al, 2003; Puñales et al, 2003). É descrito o fenômeno da “antecipação” do CMT, ou seja, há o aparecimento da doença em indivíduos progressivamente mais jovens através das gerações, sugerindo a participação de outros eventos moleculares no início do processo neoplásico (Puñales et al, 2004). Alguns polimorfismos podem modular a apresentação fenotípica do CMT em indivíduos com predisposição genética, entretanto, estudos populacionais são necessários para que a frequência de diferentes polimorfismos no proto-oncogene *RET*, assim como sua importância na expressão fenotípica do CMT, sejam estabelecidas (Magalhães et al, 2003).

III.1E. TRATAMENTO CONVENCIONAL DO CMT

Considerando-se que o estadiamento tumoral no momento do diagnóstico é o principal fator prognóstico no CMT, o diagnóstico e a intervenção cirúrgica precoces, antes do aparecimento de metástases para linfonodos cervicais e metástases à distância, são de suma importância para melhora da sobrevida, especialmente nos casos esporádicos (Raue et al, 1998).

É consenso que diagnóstico precoce do CMT seguido de tireoidectomia total e dissecação dos linfonodos cervicais centrais trazem as melhores chances de cura (Gharib et al, 1998; Orlandi et al, 2001; Scollo et al, 2003; Martins et al, 2006). No entanto, a indicação da dissecação dos linfonodos laterais pode ser controversa; existem orientações diversas pela Society of Surgical Oncology, National Comprehensive Cancer Network e “guidelines” alemãs (Scollo et al, 2003). A cura ocorre quando há ressecção completa do tumor inicial (Labriolle-Vaylet et al, 2000).

Estudo retrospectivo de 101 pacientes consecutivos portadores de CMT tratados por tireoidectomia total e dissecação central e bilateral dos linfonodos, no Institut Gustave-Roussy, encontrou metástases linfonodais em 55% dos

pacientes, incluindo CMT esporádicos, hereditários, tumores unilaterais e até tumores menores que 1 cm de diâmetro. Por esta razão, este estudo advoga tireoidectomia total e dissecação linfonodal central e lateral para todos os pacientes com CMT. Estas recomendações só não se aplicam àquelas pessoas submetidas a cirurgia profilática devido à presença da mutação do *RET* e sem evidência de doença. A dissecação de linfonodos contralaterais pode ser evitada nos portadores de tumores unilaterais sem comprometimento de linfonodos cervicais centrais e ipsilaterais (Scollo et al, 2003). Esta conduta é a mais usada atualmente, inclusive por grupos brasileiros (Puñales et al, 2004; Barbet et al, 2005).

Pacientes com normalização dos níveis basais circulantes de calcitonina e/ou CEA podem ser considerados curados cirurgicamente (Marsh et al, 1995). Recomenda-se a utilização de testes provocativos para certificar que não ocorre pico de calcitonina estimulada e para que casos de doença oculta não deixem de ser diagnosticados (Gharib et al, 1998).

O número de linfonodos acometidos encontrados na cirurgia são preditores de remissão pós cirúrgica (Scollo et al, 2003). Trinta a 50% dos pacientes já apresentam metástases ganglionares ao diagnóstico, um fator de pior prognóstico (Marsh et al, 1995). Metástases para linfonodos cervicais correlacionam-se com o tamanho do tumor primário e são mais comuns na NEM 2B, seguida pelo CMT esporádico, pelo CMTF e pela NEM 2A (Gharib et al, 1998). Apresentam pior prognóstico o NEM 2B, seguido pelo CMT esporádico, CMTF e NEM 2A.

O rastreamento genético e/ou bioquímico dos indivíduos de risco para CMT (CMT hereditários), permite o diagnóstico da doença em fases iniciais, permitindo uma intervenção cirúrgica precoce e bons índices de cura (Toledo et al, 2006).

Infelizmente, 75-80% dos CMT são esporádicos e a detecção precoce destes casos é mais difícil. Como resultado do diagnóstico tardio dos CMT esporádicos, são observadas metástases para linfonodos cervicais ou à distância em 40 a 50% destes pacientes (Martins et al, 2006). Esta estatística sombria é corroborada por outros estudos. Segundo Scollo et al, 2003, 30 a 60% dos CMT esporádicos apresentam linfonodos cervicais palpáveis ao

diagnóstico e, ao exame anatomopatológico, mais de 80% apresentam-se acometidos pelo tumor. Metástase para linfonodos cervicais está presente ainda em 10-30% dos tumores menores que 1 cm (Scollo et al, 2003).

As mortes devidas ao CMT são causadas por invasão tumoral da traquéia, dos grandes vasos cervicais ou mediastinais e por metástases à distância (Moley JF, 2003). Metástases à distância envolvem vários órgãos como fígado, pulmões, ossos e são múltiplas nos órgãos acometidos. Representam a principal causa de óbito no CMT e a sobrevida, após a descoberta delas, é de 20% em 10 anos (Dottorini et al, 1996).

Excetuando-se a cirurgia, a terapia do CMT é geralmente ineficaz, com 56% dos pacientes ficando com doença residual após a cirurgia devido à natureza do CMT que desenvolve metástases precocemente (Evans et al, 1999).

Tanto o tratamento radioterápico quanto quimioterápico são de pouca eficácia (Marsh et al, 1995; Gharib et al, 1998; Orlandi et al, 2001; Fromigüé et al, 2006; Martins et al, 2006; Messina et al, 2007). A radioterapia tem papel adjuvante à cirurgia nos casos de ressecção incompleta do tumor, doença nodular extensa e com extensão extra-tiroidiana e tem papel paliativo nas metástases ósseas, de sistema nervoso central e mediastinais (Vitale et al, 2001). Ocorre redução da recidiva tumoral local após radioterapia, mas não se obtém qualquer ganho em sobrevida (Fersht et al, 2001).

A quimioterapia apresenta pouca eficácia para o tratamento de metástases disseminadas, com resposta transitória em pequeno número de pacientes (Puñales et al, 2004). Várias combinações de doxorrubicina, 5-fluorouracil, decarbazina, estreptozocina, ciclofosfamida e vincristina produziram taxas de resposta em torno de 20% com melhora de sintomas em alguns casos; porém, todas as respostas foram parciais e transitórias e nenhum benefício em sobrevida foi demonstrado (Fromigüé et al, 2006).

A ausência de uma terapia sistêmica eficaz e o freqüente aparecimento de metástases no CMT mostram, claramente, a necessidade de desenvolvimento de outros tipos de tratamento para o CMT (Strock et al, 2006).

III.1F. A BUSCA POR OUTRAS TERAPÊUTICAS PARA O CMT

Estudos *in vitro* e/ou em animais:

A. Inibidores farmacológicos do proto-oncogene *RET*: há trabalhos na literatura de vários inibidores de tirosina quinase (Fagin, 2004). Carlomagno et al, 2006, mostraram inibição do crescimento das células de carcinoma medular *in vitro* e de fibroblastos com *RET* mutado (*RET*/C634R e *RET*/M918T) *in vitro* e *in vivo*, utilizando o inibidor de tirosina quinase BAY 43-9006. Strock et al, 2006, demonstraram que o uso combinado do inibidor de tirosina quinase CEP-751 com irinotecan (camptotecina, inibidora de topoisomerase I) promoveu cura em 5/9 ratos portadores de tumores medulares. A remissão persistiu por mais de 130 dias. Concluiu que irinotecan isolado ou associado a inibidor de tirosina quinase pode ser útil para o tratamento do CMT.

B. Anti-inflamatórios

B.1. Redução de quimiorresistência do CMT através de inibidores da ciclo-oxigenase 2 (COX-2): as células tumorais do CMT superexpressam o gene MDR-1 (multidrug resistance 1), que codifica uma proteína transmembrana (P-gp: permeability glicoprotein) que antagoniza o acúmulo de agentes citotóxicos no interior das células. As células TT expressam COX-2 e MDR-1. Rofecoxib, um inibidor COX-2 seletivo, sensibilizou as células TT aos efeitos citotóxicos da doxorubicina (Zatelli et al, 2005).

B.2. Inibição de crescimento tumoral por indometacina: A indometacina, anti-inflamatório não esteroide que inibe a produção de prostaglandinas (inibidor COX-1 e COX-2), reduziu a proliferação das células TT *in vitro* e em camundongos assim como reduziu os níveis de calcitonina. Níveis elevados de prostaglandinas promovem angiogênese e fazem retro-alimentação negativa de resposta imune celular mediada por linfócitos T e células NK (natural killer) (Quidville et al, 2005).

C. Inibidores do gene MDR-1: Vários medicamentos e quimioterápicos inibem a expressão do gene MDR-1. Estudos com verapamil, ciclofosfamida A, SDZ, PSC 833 apresentam boa atividade quimioterápica *in vitro*, porém são muito tóxicos *in vivo* (Vitale et al, 2001).

D. Radioimunoterapia Direcionada (Figura 1): Em 2002, Kraeber-Bodéré et al, demonstraram significativo efeito anti-tumoral em camundongo *nude* com células TT após tratamento com anticorpo biespecífico (CEA x DTPA-indium – anticorpo F6-734) e hapteno bivalente (^{131}I x DTPA-indium). Tanto o paclitaxel quanto a doxorrubicina são agentes citotóxicos e radiosensibilizadores; porém, apenas o paclitaxel teve efeito sinérgico com esta radioimunoterapia direcionada.

Figura 1. O anticorpo biespecífico possui dois braços, um se liga ao antígeno tumoral e o outro é específico para o hapteno. Este anticorpo localiza o tumor, e é clareado do sangue antes que se administre o peptídeo-hapteno radiomarcado. Este se liga ao tumor através do anticorpo biespecífico. Modificada de Sharkey & Goldenberg, 2006.

Estudos em humanos:

Radioterapia Específica para CMT: ^{131}I -MIBG e ^{111}In -pentetretotide são utilizados para captação seletiva no CMT. Anticorpos monoclonais radiomarcados com αCEA também são utilizados para radioterapia específica no CMT (Vitale et al, 2001).

Radioimunoterapia Direcionada (Figura 1): Em 2006, Kraeber-Bodéré et al, realizaram um estudo fase I com pacientes portadores de CMT, para estabelecer a dose ideal de anticorpo biespecífico F6-734 (CEA x DTPA-indium) a ser administrada, o intervalo adequado entre as administrações e a dose correta de radionucleotídeo. Do mesmo grupo de Kraeber-Bodéré, Chatal et al, 2006, publicaram resultados obtidos de 29 pacientes com CMT avançado e progressivo que receberam esse mesmo anticorpo biespecífico juntamente com o hapteno bivalente com ^{131}I . Resultado: RIT direcionada por CEA induziu estabilização prolongada da doença e aumento na sobrevida. Como os efeitos anti-tumorais sinérgicos entre RIT (radioiodoterapia) e quimioterapia já foram demonstrados em estudos animais, esta possibilidade deve ser testada em breve em humanos para tumores sólidos com a radioimunoterapia direcionada.

Quimioembolização de metástases hepáticas: Em um estudo com 11 pacientes, a quimioembolização de metástases hepáticas trouxe melhora sintomática em todos os pacientes e remissão transitória ou estabilização em 60% deles (Lorenz et al, 2005). Um outro estudo com 12 pacientes obteve resultados semelhantes e concluiu que as melhores respostas são observadas em pacientes com metástases predominantemente hepáticas e com doença metastática não tão avançada (Fromigué et al, 2006).

Modificadores de Resposta Biológica: Octreotídeo e interferon- α são utilizados, isolados ou associados, em pacientes com doença metastática com o objetivo de reduzir os elevados níveis de calcitonina e melhorar os sintomas a eles relacionados, como rubor e diarreia. Promovem uma melhora na qualidade de vida com ou sem redução da massa tumoral. Têm ação anti-proliferativa e estimulam resposta imune anti-tumoral (Vitale et al, 2001).

III.2. TERAPIA GÊNICA

A concepção da terapia gênica foi resultado da observação de que certas doenças eram causadas pela herança de um único gene funcionalmente

defeituoso e que, portanto, poderia ser tratado pela introdução e expressão da cópia normal do gene mutado ou deletado.

O conceito original de terapia gênica como uma “terapia de suplementação de gene” rapidamente se transformou em um conceito mais abrangente, o qual reconhece como terapia gênica qualquer estratégia que use material genético para prevenir ou curar variadas doenças, inclusive patologias genéticas multifatoriais e somáticas, tais como câncer (Barzon et al, 2004).

A terapia gênica para o câncer corresponde a 68,5% dos protocolos desta modalidade de tratamento, com 2392 pacientes envolvidos. A Figura 2 mostra as principais estratégias empregadas nos protocolos de terapia gênica em câncer (Barzon et al, 2004).

Figura 2. Pesquisas clínicas de terapia gênica em câncer (n = 403) agrupadas por tipo de estratégia empregada.

O sistema imunológico do organismo humano tem uma capacidade natural de reconhecer células cancerosas e combatê-las. A imunoterapia é um tratamento que estimula e fortalece esta função (Associação Brasileira do Câncer, Anderson Cancer Center, National Cancer Institute). Outras estratégias empregadas na terapia gênica do câncer são: ativação de genes supressores de tumor (anti-oncogenes), inibição da expressão de genes indutores de tumor (oncogenes), introdução na célula tumoral de um gene exógeno que provoca a morte dela (oncólise) ou que permite a aplicação de agentes citotóxicos (suicida). Na quimioproteção busca-se proteção das células normais contra a quimioterapia, por exemplo, através da adição de proteínas (Santos & Bonatelli, 1999).

Os primeiros resultados das pesquisas clínicas mostraram que certos pontos da terapia gênica precisam ser melhorados, principalmente a eficiência do(s) gene(s) terapêuticos e a eficiência e seletividade da sua transferência (Barzon et al, 2004).

Para um protocolo de terapia gênica ser bem sucedido é fundamental que se consiga elevada transcrição e tradução do gene terapêutico em um número suficiente de células-alvo (tumoriais). Além da necessidade da transferência do(s) gene(s) terapêutico(s) ser eficaz, é fundamental que ela seja específica, isto é, que só atinja as células-alvo. Segurança é uma preocupação constante na terapia gênica (Barzon et al, 2004).

III.2A. TERAPIA GÊNICA EM CÂNCER DE TIREÓIDE

A Terapia Gênica é uma alternativa bastante atraente em Câncer de Tireóide e apresenta duas grandes vantagens a serem citadas. A primeira é que certos genes expressos por tecido tireoidiano, tumoral ou não, tais como tireoglobulina (Tg), receptor de TSH (TSH-R) e calcitonina (CT) têm expressão limitada ou inexistente em outros tecidos. Portanto, o emprego de um vetor que utilize um gene terapêutico, sob controle de um promotor tecido-específico (promotor de Tg ou CT) proporciona uma terapêutica de maior especificidade e, conseqüentemente, menor toxicidade. A segunda vantagem é que, se houver destruição das células tireoidianas não tumorais com o tratamento, faz-se reposição com levo-tiroxina e isso não trará graves conseqüências, como ocorreria se o pulmão, cérebro ou fígado fossem destruídos, por exemplo. (DeGroot et al, 2001). Tal vantagem também se aplica à terapia gênica do carcinoma medular de tireóide, pois as células C são consideradas não essenciais (Messina et al, 2007).

III.2B. TERAPIA GÊNICA NO CMT

A terapia gênica – a transferência de material genético (transgenes) com propósito terapêutico – é uma alternativa potencialmente útil no tratamento do CMT. A expressão tecido-específica de genes de calcitonina permite seu uso

com a finalidade de garantir transcrição específica de transgenes na Terapia Gênica do CMT.

Quatro principais estratégias em Terapia Gênica vêm sendo empregadas para o CMT (Drosten M e Pützer BM, 2003; Spitzweg et al, 2004; Messina et al, 2007):

1. Terapia Gênica Corretiva
2. Terapia Gênica Cito-redutora
3. Terapia Gênica Imunomodulatória
4. Terapia Gênica Combinada: cito-redutora e imunomodulatória

1. **Terapia Gênica Corretiva**: restabelece a função normal de um gene deletado ou mutado, através da ativação de genes supressores de tumor (anti-oncogenes) ou inibição da expressão de genes indutores de tumor (oncogenes), com redução da produção de onco-proteínas.

Embora a transformação de tecido normal em tumoral geralmente envolva várias mutações diversas, a correção de um defeito pontual principal pode ser suficiente para reverter o fenótipo maligno.

1A. Inibição do *RET* oncogênico através da expressão do *RET* mutante dominante-negativo (Tabela 3A)

O *RET* oncogênico tem função anti-apoptótica; um adenovírus que expressa RET dominante-negativo, sob controle do promotor de calcitonina modificado (TSE2.CP1 – Messina et al, 2000) induziu fortemente a apoptose em células TT *in vitro* e foi eficaz em inibir crescimento tumoral quando as células TT foram infectadas *ex vivo*. Além disso, foi capaz de retardar o crescimento tumoral das células TT em poucos camundongos *nude*, quando o adenovírus foi injetado diretamente no tumor já formado *in vivo* (Cosma et al, 1998; Drosten et al, 2002; Drosten et al, 2003; Putzer & Drosten, 2004).

Mecanismo de ação: o adenovírus expressa RET dominante-negativo da Doença de Hirschsprung, que se liga ao RET mutado/oncogênico; este complexo fica retido no retículo endoplasmático e não se dirige à membrana

celular, impedindo a ativação constitutiva da tirosina quinase promotora de carcinogênese.

1B. Ribozimas que clivam especificamente moléculas de RNA de *RET* oncogênico

Ribozimas são moléculas de RNA catalíticas, ou seja, enzimas que reconhecem seqüências específicas de RNA e clivam a fita de RNA em um ponto definido (Messina et al, 2007). Parthasarathy et al (1999) fizeram uma ribozima que cliva a seqüência resultante da mutação no proto-oncogene *RET* do códon 634 de TGC para TAC. Com isso, as células NIH3T3 que expressavam a ribozima ativa (RETC634) passaram a não mais desenvolverem colônias, como ocorria com as células que expressavam o *RET* selvagem do códon 634 mutado.

1C. Oligonucleotídios “anti-sense” que inibem crescimento e induzem apoptose em células cancerosas

Oligonucleotídios são seqüências curtas de DNA ou RNA, com vinte bases ou menos. Oligonucleotídios “anti-sense” são moléculas de fita-simples de RNA que se hibridizam com a fita-alvo de RNA complementar, impedindo a tradução (processo que utiliza um RNA mensageiro molde para formar uma proteína). Como resultado final, alcança-se a inibição da expressão do gene (Messina et al, 2007).

No CMT há super-expressão do gene anti-apoptótico *survivin*. Du et al (2006), através de oligonucleotídios anti-survivin (ASODNs), induziram apoptose e inibiram crescimento das células TT *in vitro*. Também ocorre a super-expressão do gene anti-apoptótico *Bcl-2* (B-cell chronic lymphocitic leukemia/lymphoma 2) no CMT, responsável por resistência a uma série de sinais indutores de apoptose como radiação, quimioterapia e esteróides.

No câncer de próstata que é um tumor de crescimento lento como o CMT, bons resultados foram obtidos com a administração endovenosa de um oligonucleotídio anti-sense para mRNA de *Bcl-2*, associada a docetaxel. Foi

obtida boa resposta clínica anti-tumoral em um estudo clínico fase II (Tolcher et al, 2005). Ainda não há estudo com este oligonucleotídeo “anti-sense” no CMT.

A efetiva inibição de sinais celulares envolvidos na tumorigênese através de oligonucleotídeos, ribozimas ou genes codificadores de proteínas dominante-negativas, requer que estas moléculas sejam introduzidas e expressas em todas as células-alvo pois, nestes modelos terapêuticos, não ocorre o efeito *bystander* (Messina et al, 2007).

1D. Terapia Gênica Corretiva para Cânceres de Tireóide não Medulares

Mutações no gene supressor de tumor p53 estão presentes em grande parte dos tumores, inclusive nos carcinomas de tireóide pouco diferenciados e anaplásicos, porém, não são comuns no CMT. Há trabalhos com êxito em re-expressão do p53 selvagem em carcinomas de tireóide não medulares (Nagayama et al, 2000; Nagayama et al, 2001; Imanishi et al, 2002; Narimatsu et al, 1998).

Também há trabalhos realizados em carcinoma de tireóide não medular, utilizando oligonucleotídeos anti-sense para proteína HMGI(Y) com bons índices de indução de apoptose (Berlingieri et al, 1995; Scala et al, 2000) e para *c-myc* (Cerutti et al, 1996; Schumutzler & Koehrlé, 2000), que obteve redução da proliferação das células tiroidianas tumorais.

2. Terapia Gênica Cito-redutora: leva ao alvo um gene exógeno que provoca a morte da célula ou permite a aplicação de agentes citotóxicos.

2A. Terapia Gênica Suicida (Tabela 3A)

Terapia gênica suicida, também conhecida como “GDEPT” (“Gene-directed enzyme prodrug therapy”) é um tratamento realizado em duas etapas. Primeiramente, o gene é levado até as células tumorais e expresso. Depois, a pró-droga é administrada e é seletivamente ativada pela enzima expressa (Springer et al, 2000).

O primeiro sistema “GDEPT” descrito foi o gene da timidina quinase do Herpes Simplex virus (HSVtk) em combinação com a pró-droga ganciclovir (antiviral usado para tratar infecções por citomegalovírus) (Fillat et al, 2003). A timidina quinase fosforila o ganciclovir (GCV) que forma um análogo de nucleotídeo tóxico, cuja incorporação à fita de DNA, cessa a replicação celular, levando as células em divisão à apoptose (Beltinger et al, 1999) (Figura 3).

Existe um outro meio de destruir as células não infectadas pelo HSV-tk *in vitro* e *in vivo*. Essa destruição se dá pelo efeito “bystander”, que é a passagem do ganciclovir fosforilado da célula transfectada para as células vizinhas através das junções inter-celulares das membranas celulares (“gap-junctions”) (Figura 3).

Figura 3: Esquema Sistema Suicida HSV-tk/GCV

- 1-3. O plasmídeo contendo o gene da timidina quinase entra na célula tumoral por um vetor adenoviral, que o libera no citoplasma.
4. O plasmídeo entra no núcleo, onde ocorre a transcrição do gene da timidina quinase
5. O mRNA da timidina quinase será traduzido, originando a proteína HSV-tk (é a pró-droga, ainda inativa)
- 6-7. O ganciclovir fosforila HSV-tk (HSV-tk ativo), que vai ao núcleo induzir apoptose por término de replicação de DNA ou passa para as células vizinhas levando-as também à apoptose (efeito *bystander*).

Numerosos estudos afirmam que o sistema HSV-tk/GCV tem alta eficácia em matar células tumorais em cultura, mesmo quando menos de 1% do total das células está expressando HSV-tk (Marconi et al, 2000).

Um outro sistema GDEPT empregado no CMT utiliza a enzima da *Escherichia coli* PNP (purine nucleoside phosphorylase), que converte a pró-

droga não tóxica fosfato fludarabina em 2-fluoroadenina. Este metabólito ativo é um análogo de ATP, que inibe as reações ATP-dependentes. Células em repouso e em proliferação são mortas pela inibição da síntese de RNA e proteínas. O sistema PNP-fluoroadenina se difunde livremente pelas membranas celulares, ou seja, o efeito *bystander* local é bem eficaz (Messina et al, 2007).

2B. Genes tóxicos (Tabela 3A)

A expressão do gene do óxido nítrico (NO) é altamente citotóxica para as células tumorais porque o óxido nítrico intracelular interfere com a respiração celular e leva células em divisão à apoptose. Similarmente ao GDEPT, o óxido nítrico também se difunde para as células vizinhas não transfectadas, ou seja, também há o efeito *bystander* (Messina et al, 2007).

2C. Expressão do gene NIS (simportador sódio-iodo) (Tabela 3A)

As células C não captam iodo. Porém, se elas passam a expressar o gene do NIS (SLC5A5), elas passam a ter a capacidade de captar iodo e novas possibilidades terapêuticas (radioiodoterapia) e diagnósticas (captação iodo ou tecnécio) surgem para o CMT. A expressão do gene NIS tem sido empregada para outros cânceres de tireóide (Smit et al, 2000; Smit et al, 2002; Shimura et al, 1997), além do CMT (Spitzweg et al, 2001a; Cengic et al, 2005); e para outros tipos de tumores como, por exemplo, o carcinoma de próstata (Spitzweg et al, 2001b).

2D. Terapia Gênica Cito-Redutora para Cânceres de Tireóide não Medulares

Como já foi dito, defeitos de p53 não são comuns em CMT. O adenovírus ONYX-015 se replica seletivamente em células tumorais com p53 defeituoso (carcinomas tireoidianos bem e pouco diferenciados), provocando apoptose dessas células (Portella et al, 2002; Portella et al, 2003). Trabalho de Ye et al, 2002, através de retrovírus, introduziu em células foliculares o gene da

endostatina. A endostatina é um potente agente anti-angiogênico. Foi observada redução tumoral *in vivo*, em camundongos *nude*, após a expressão do gene da endostatina que reduziu bem a vascularização do tumor.

3. Terapia Gênica Imunomodulatória: induz expressão de um gene que aumenta a resposta imunológica contra tecidos tumorais (Russell, 2000).

As células tumorais expressam antígenos que induzem resposta imune pelo hospedeiro. Mas, nem sempre este sistema consegue impedir o desenvolvimento de cânceres. Para uma imunoterapia eficaz, é vital que se aumente a resposta imunológica aos antígenos tumorais (Zhang et al, 1999).

Existem várias vantagens no emprego de genes imunomoduladores. Ocorre resposta contra células tumorais tanto próximas quanto distantes do local onde o gene imunomodulador está sendo expresso, fato importante para o tratamento de metástases à distância. Outro benefício é a persistência da imunidade anti-tumoral mesmo após o gene não estar mais sendo expresso; ou seja, há memória imunológica (DeGroot & Zhang, 2001).

Uma estratégia comum é introduzir genes de citocinas nas células tumorais para atrair células natural-killer (NK) e células apresentadoras de antígenos (APCs), como, por exemplo, células dendríticas e macrófagos, que estimulam uma resposta imune mediada por linfócitos T contra antígenos tumor-específicos. Dentre os genes de citocinas mais comumente usados para terapia gênica de câncer estão os codificadores de: IL-2 (interleucina 2), IL-4, IL-7, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ (interferon γ), TNF- α , TGF- β , e GM-CSF (Barzon et al, 2004; Messina et al, 2007).

A interleucina 12 é considerada uma das mais potentes (se não a mais potente) citocinas utilizadas na terapêutica contra o câncer. (Zhang et al, 2000b; DeGroot et al, 2001). Sua administração sistêmica inibe o crescimento tumoral e suprime metástases, porém, causa uma severa toxicidade dose-dependente em animais e humanos (DeGroot et al, 2001).

4. Terapia Gênica Combinada: cito-redutora e imunomodulatória

Considerando-se que tanto o gene suicida HSV-tk/GCV quanto genes secretores de interleucinas têm efeitos anti-tumorais, parece promissor seu uso conjunto. Há relatos de terapia combinada em alguns cânceres com boa resposta (O'Malley et al, 1997; Chen et al, 1996; Wigginton et al, 1996). Dois pacientes com carcinoma anaplásico de tireóide foram tratados com retrovírus contendo HSV-tk e interleucina 2, com resposta parcial e poucos efeitos adversos (Barzon et al, 2005).

Estudos pré-clínicos com linhagens celulares *in vitro* e em modelos animais demonstraram claramente a eficácia da estratégia do sistema suicida HSV-tk/GCV e dos genes que expressam citocinas (especialmente IL-12) em amplificar resposta imunológica, ambos facilitando a destruição de células tumorais (DeGroot et al, 2001). A Tabela 3C mostra os bons resultados de estudos com Terapia Gênica Combinada em CMT em modelos animais e em cultura de células.

Os resultados freqüentemente superiores alcançados com a combinação de um sistema suicida e um gene imunomodulador, em comparação com cada uma destas terapias aplicadas isoladamente, ocorrem por várias razões: 1) a indução de morte celular através de metabólitos tóxicos serve para qualquer tipo de células, inclusive para células radio e/ou quimio resistentes; 2) o efeito desejado (apoptose celular) é alcançado mesmo com expressão gênica por um curto período de tempo; 3) devido ao efeito "bystander", não é necessário infectar todas as células tumorais, basta apenas uma parcela delas; 4) indução de forte resposta imunológica; 5) sinergismo entre o sistema HSV-tk e citocinas.

Tabela 3A. Estudos Realizados Empregando Terapia Gênica em Carcinoma Medular de Tireóide com Modelos Animais ou Cultura de Células

Autor	Vetor	Gene Terapêutico Promotor (Pmt)	Modelo	Resultados
Terapia Gênica Corretora				
Drosten et al 2002, 2003	Adenovírus (Ad)	Gene: dn-RET Pmt: TSE2.CP1	<i>In vitro</i> (1) e em camundongos <i>nude</i> (2)	1. Apoptose células TT 2. Supressão crescimento tumoral, ↑ sobrevida
Terapia Gênica Citotóxica				
Soler et al 2000	Plasmídio	Gene: óx.nítrico sintase Pmt: CMV	Ratos WAG/Rij	Apesar de baixa transfecção, o volume do tumor ↓ 35%, mostrando forte efeito “bystander”
Zhang et al 2000 a	Adenovírus (Ad)	Gene: HSV/tk Pmt: CMV	Ratos WAG/Rij	Redução ou estabilização de tumores de até 100 mm ³ , não houve boa resposta em tumores >400 mm ³
Minemura et al, 2000	Adenovírus (Ad)	Gene: HSV/tk Pmt: calcitonina nativo (CALC-I)	<i>in vitro</i>	Promotor de especificidade parcial; que melhora quando o gene tk é inserido no exon 4 deste pmt.
Messina et al 2003	Adenovírus (Ad)	Gene: PNP e CT/PNP Pmt: TSE2.CP1	<i>in vitro</i>	1. Pmt específico céls. TT 2. CT/PNP ↑ especificidade, mas ↓ ação PNP.
Cengic et al 2005	Plasmídio	Gene: SLC5A5 Pmt: TSE2.CP1	<i>in vitro</i> radioiodoterapia	Morte de 86% das células TT que expressaram NIS.

Abreviações Tabela 3A/B/C:

Genes: dn-RET (*RET* dominante-negativo); GM-CSF (fator estimulante de colônia de granulócito-monócito); HSV/tk (timidina quinase do herpes simplex virus); IL-2 (interleucina 2); hIL-2 (IL-2 humana); mIL-2 (IL-2 murina); IL-12 (interleucina 12); mIL-12 (IL-12 murina); PNP (purina nucleosídeo fosforilase); CT (calcitonina); CT/PNP (minigene de calcitonina apenas com introns e exons CT-específicos); SLC5A5 (gene NIS).

Promotores: CMV (citomegalovírus); TSE2.CP1 (promotor da calcitonina CT/CGRP modificado)

* CD: células dendríticas

Animais: Rato WAG/Rij (desenvolve CMT espontaneamente com o envelhecimento); Camundongo *nude* (não possuem timo, são incapazes de produzir linfócitos T maduros; por isto, muito usados para desenvolverem tumores. Chamados de *nude* pela aparência, são desprovidos de pêlos).

Tabela 3B. Estudos Realizados Empregando Terapia Gênica em Carcinoma Medular de Tireóide com Modelos Animais ou Cultura de Células(exceção Schott et al, 2001)

Autor	Vetor	Gene Terapêutico Promotor (Pmt)	Modelo	Resultados
Terapia Gênica Imunomoduladora				
Lausson et al 1996	Adenovírus (Ad)	Gene: IL-2	Rato Wag/Rij Após transdução <i>in vitro</i> das células de CMT de rato (CMT-IL2), elas foram re-introduzidas no rato	As células CMT-IL2 não desenvolveram tumor no rato, como as células CMT fizeram.
Zhang et al 1998 a	Adenovírus (Ad)	Gene: mIL-2 Pmt: CMV	Camundongo BALB/c (CMT murino)	Após receber este Ad, os camundongos com re-inoculação de células de CMT selvagens, não desenvolveram tumor (imunidade a longo prazo)
Zhang et al 1998 b	Adenovírus (Ad)	Gene: mIL-2 Pmt: CMV	Ratos WAG/Rij (CMT murino)	A injeção intra-tumoral de AdCMVIL2 promoveu regressão tumoral em 69% dos animais com tumores $\leq 30 \text{ mm}^3$. Tumores $> 30 \text{ mm}^3$ ficaram com tamanho estável. Comprovou-se imunidade a longo prazo nos animais curados.
Zhang et al 1999	Adenovírus (Ad)	Gene: mIL-2 Pmt: CMV	Ratos WAG/Rij (CMT rato)	Cura de 42,9% dos animais após injeção intra-tumoral, sem efeitos colaterais, ou seja, com baixa toxicidade
Zhang & DeGroot 2000 b	Adenovírus (Ad)	Gene: mIL-12 Pmt: CMV	Ratos WAG/Rij (CMT rato)	A injeção intratumoral direta do Ad, levou à erradicação da maioria dos tumores (86%) e conferiu imunidade a longo prazo (77%). Este Ad parece ser mais eficiente que AdCMVIL-2 e AdCMVtk.
Yamasaki et al, 2002	Adenovírus (Ad)	Gene: mIL-12 Pmt:TSE2.CP1	-Cultura de células de CMT de rato -Ratos WAG/Rij	1. O tumor reduziu até 75%, em $>60\%$ animais. 2.Imunidade a longo prazo. 3.Baixa toxicidade.
Haupt et al 2001	Plasmídios	Plasmídios secretores de: 1.Préprocalcitonina 2.GM-CSF	"vacinoterapia" em ratos	Imunização dos ratos contra préprocalcitonina
Schott et al 2001	-	Estímulo das CD* com antígenos CEA e calcitonina	"vacinoterapia" em humanos	Resposta clínica em 3 de 7 pacientes (redução de metástase).

Tabela 3C. Estudos Realizados Empregando Terapia Gênica em Carcinoma Medular de Tireóide com Modelos Animais ou Cultura de Células

Autor	Vetor	Gene Terapêutico Promotor (Pmt)	Modelo	Resultados
Terapia Gênica Combinada				
Soler et al 1999	Retrovírus	Genes: IL-2 e tk	Rato Wag/Rij. Após transdução <i>in vitro</i> das células de CMT de rato (CMT-tk ou CMT-IL2), elas foram re-introduzidas no rato	Quando os ratos (CMT-tk) foram tratados com GCV houve erradicação tumoral em 60% dos animais; associando (CMT-IL2), houve erradicação em 86%
Zhang & DeGroot 2001 b	Adenovírus (Ad)	Genes tk e hIL-2 no mesmo vetor. (AdCMVtkhIL-2) Pmt: CMV - Foi feita comparação dos resultados com AdCMVtk e AdCMVhIL-2.	Ratos WAG/Rij (CMT rato)	1. % tumores destruídos com injeção intratumoral dos Ads: AdCMVtkhIL-2 (63%), AdCMVhIL-2 (38%) e AdCMVtk (12%). 2. 79% dos ratos tratados com AdCMVtkhIL-2 desenvolveram imunidade. 3. Não houve benefício em injetar mistura dos Ads AdCMVtk e AdCMVhIL-2 (dados não mostrados).
Yamazaki et al, 2004	Adenovírus (Ad)	Genes: mIL-12 e HSV/tk em dois vetores (AdTCPtk, AdTCPmIL-12) Pmt: TSE2.CP1	<i>In vitro</i> e em ratos WAG/Rij	Maior redução de tumor no rato após inoculação conjunta de AdTCPtk e AdTCPmIL-12 do que com qualquer um dos dois vetores isolados.

III.3. INTERLEUCINA 12

A interleucina 12 (IL-12) é uma citocina heterodimérica de 70 kDa (contém duas subunidades: p35 de 35 kDa e p40 de 40 kDa, unidades por pontes sulfeto) com papel fundamental para o início da resposta imunológica Th1-mediada por ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, que secretam IL-2 e IFN- γ . Estes promoverão ativação das células natural killer (NK) e das células apresentadoras de antígeno (APC). Conseqüentemente, haverá deflagração de forte resposta imunológica celular (Leong et al, 2003). A IL-12 também induz a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos. Tanto linfócitos T quanto células apresentadoras de antígenos ativados produzem IFN γ , uma citocina com propriedades anti-angiogênicas (Yamasaki et al, 2002).

A IL-12 tem participação importante nas infecções bacterianas, fúngicas, parasitárias e no câncer. A administração de IL-12 como vacina contra câncer, aumenta a atividade das células T citotóxicas (CD8⁺) (Leong et al, 2003).

A atividade biológica da interleucina 12 depende da formação de um complexo receptor – proteína de IL-12 de alta afinidade, que é dada pela interação dos receptores IL-12R β 1 e IL-12R β 2 com o heterodímero p35-p40 (Presky et al, 1998).

Efeitos da IL-12 na produção de citocinas e proliferação de linfócitos

A interleucina 12 é o estímulo conhecido mais potente à produção de IFN- γ pelos linfócitos. A IL-12 induz produção de IFN- γ por células T ativadas e em repouso, e pelas células NK, *in vitro* e *in vivo*. Várias citocinas como a IL-1, IL-2, IL-15 e TNF- α , agem sinergicamente com a IL-12 no estímulo à secreção de IFN- γ .

A IL-12 aumenta a expressão do receptor de IL-2 nas células NK, e aumenta a proliferação das células NK mesmo em concentrações muito baixas de IL-2 (Robertson & Ritz, 1996).

Efeitos da IL-12 nos linfócitos citotóxicos

Os linfócitos citotóxicos são assim denominados devido a sua habilidade em matar outras células. Dois tipos principais de linfócitos citotóxicos foram identificados: CTL (linfócito T citotóxico) e células natural killer (NK).

Os CTLs geralmente são originados de células T CD8 ativadas e, apenas em algumas circunstâncias, de células T CD4 ativadas. A destruição da célula alvo é desencadeada após a interação entre receptores de células T e peptídeos antigênicos acoplados a glicoproteínas de histocompatibilidade (MHC) na célula alvo. Portanto, os CTLs são antígeno-específicos e MHC-restritos.

Por sua vez, as células NK não expressam receptores de células T e sua citotoxicidade não é limitada às células alvo que apresentam antígenos acoplados a proteínas de membrana MHC. As células NK podem destruir células tumorais ou células infectadas por vírus através de um processo anticorpo-independente conhecido como “natural killing” ou através de um

processo conhecido como citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC), no qual as células alvo possuem anticorpos em suas membranas.

CTLs e células NK agem de modo complementar para destruir células tumorais ou células infectadas por patógenos intracelulares. Ambos são potentemente estimulados pela IL-12. A IL-12 estimula a proliferação e a diferenciação dos linfócitos CD8 em CTLs; além disso, também estimula a atividade citolítica dos CTLs e das células NK, por exemplo, através do aumento da expressão de moléculas efetoras de citólise como perforinas e serinas esterases. A IL-12 também aumenta a expressão de várias moléculas de adesão envolvidas na ligação das células NK às células alvo.

Em concentrações ótimas, a IL-2 consegue amplificar a capacidade citotóxica das células NK mais que a IL-12; contudo, a quantidade de IL-12 requerida para concentração ótima é 100 vezes menor que a de IL-2, em termos molares (Robertson & Ritz, 1996).

Efeitos da IL-12 nas células T “helper”

Os linfócitos T CD4 ativados podem se diferenciar em células T “helper” tipo 1 (Th1) ou tipo 2 (Th2).

As células Th1 secretam predominantemente IL-2, IFN- γ e TNF, promovem diferenciação de células T CD8 ativadas em CTLs e de monócitos em macrófagos. Além disso, estimulam atividade citolítica das células NK e estimulam a produção de anticorpos pelos linfócitos B ativados, para induzir citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC), pelas células NK e por macrófagos. Em resumo, as células Th1 promovem imunidade celular contra patógenos intracelulares e contra células tumorais.

Ao contrário das células Th1, as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10, que inibem a ativação de monócitos e células NK, e promovem diferenciação das células CD8 em células supressoras não citotóxicas. Portanto, as citocinas Th2 inibem a imunidade celular e estimulam resposta a alérgenos e helmintos, através de eosinofilia e secreção de imunoglobulina E (IgE).

A IL-12 estimula a via Th1 diretamente através da diferenciação das células CD4 ativadas em células efetoras Th1 e indiretamente através da indução de secreção de IFN- γ . Portanto, aumenta a imunidade celular através da diferenciação e atividade das células CD4 ativadas, das células CD8 e das células NK (Robertson & Ritz, 1996).

A atividade anti-tumoral da interleucina 12

A IL-12 é produzida principalmente pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos, monócitos e células dendríticas. Sua atividade anti-tumoral dá-se através da ativação dos CTLs e células NK, diferenciação de células CD8 e CD4 em CTLs, balanço de resposta Th direcionada mais para Th1 que Th2, estímulo à produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos e atividade anti-angiogênica dependente de IFN- γ . A atividade anti-tumoral da IL-12 é comprovada em tumores de diversas histologias (Smyth et al, 2000). Terapia gênica por eletroporação de plasmídeo contendo gene da IL-12 murina mostrou regressão tumoral (carcinoma de células escamosas murinas) em camundongos e indução de memória imunológica por mais de 11 meses. Houve aumento de expressão de IL-12, IFN- γ , redução da densidade vascular tumoral e aumento de infiltração de células CD8 no tumor. Uma vez que a terapia gênica com IL-12 por eletroporação é de fácil administração e eficaz, poderia ser aplicada no tratamento de cânceres de acesso fácil a eletrodos, como tumores de cabeça e pescoço (Li et al, 2002). Diversos trabalhos em CMT também demonstraram redução tumoral e memória imunológica com gene terapêutico da IL-12 murina (Tabela 3). A atividade da IL-12 na imunidade celular parece ser a base para a erradicação de tumores nas pesquisas com animais ou humanos (Zhang et al, 2000b).

Interleucina 12 otimizada

O método de DNA *shuffling* (“Embaralhamento de DNA”) é empregado para recombinar seqüências homólogas de DNA randomicamente fragmentadas, durante a evolução molecular *in vitro* (Silva et al, 2003) (Figura 5).

Através do método de DNA *shuffling* dos genes da subunidade 35 e 40 da interleucina 12 de sete espécies de mamíferos, Leong e colaboradores produziram uma IL-12 otimizada (“evolved”), mais potente que a IL-12 humana. Aplicou-se DNA *shuffling* nas seqüências de DNA codificadoras das subunidades 35 e 40 da IL-12 de humano, macaco *Rhesus*, vaca, porco, cabra, cachorro e gato (Leong et al, 2003).

Figura 5. Técnica de Embaralhamento de DNA (DNA “Shuffling”)

Na técnica do DNA “shuffling” utilizada por Leong e colaboradores, partiu-se de uma família de genes das subunidades p35 e p40 da interleucina 12 de várias espécies animais. Através da digestão enzimática, obtém-se fragmentação randômica. Os fragmentos hibridizam-se entre si durante a reação de PCR (Polimerase Chain Reaction) sem adição de oligonucleotídeos. A mistura de fragmentos hibridizados é submetida a outra reação de PCR com oligonucleotídeos, obtendo-se, enfim, vários genes recombinantes que, neste caso, foram testados para se selecionar as subunidades 35 e 40 mais indutoras de resposta imune (Leong et al, 2003).

A melhor IL-12 otimizada obtida mostrou-se superior à humana por: 1. induzir uma proliferação 128 vezes maior de células T humanas que a IL-12 humana; 2. incrementar em 10 vezes a atividade específica de diferenciação para Th1; 3. ter conseguido melhor expressão e homogeneidade do heterodímero (ev35+ev40) em mamíferos. Pode-se concluir que uma IL-12 de maior expressão e maior atividade biológica, será capaz de proporcionar uma melhor resposta terapêutica no tratamento do câncer (Leong et al, 2003).

III.4. IMUNOVIGILÂNCIA E IMUNOTERAPIA

III.4A. CONTROLE IMUNOLÓGICO DO CÂNCER

A teoria da imunovigilância destaca a importância do sistema imunológico contra tumores. Resultados de diversos trabalhos a partir de 1990, apontavam para o interferon gama (IFN- γ) como molécula chave na imunovigilância contra tumores. Posteriormente, foi demonstrado que outra molécula, a perforina, também possui importante participação. A perforina é um dos componentes dos grânulos de células T citotóxicas e células NK que são essenciais na lise mediada por linfócitos de uma série de alvos celulares, incluindo células tumorais. Os resultados que são considerados os maiores indícios da existência da imunovigilância contra tumores, sendo esta dependente tanto do IFN- γ quanto da presença de linfócitos funcionais, foram obtidos por Shankaran e colaboradores utilizando camundongos deficientes para a ativação da recombinase (*knock out* para RAG-2), portanto sem linfócitos B e T funcionais ou células NK de origem T (Shankaran, 2001). Estes animais, quando submetidos a estímulos carcinogênicos tinham uma incidência de tumores muito maior que os correspondentes controles sem as mutações que levam à imunodeficiência.

Estudos adicionais demonstraram resultados semelhantes quando diferentes componentes do sistema imunológico como linfócitos T, células NK, IFN- γ ou IL-12 eram bloqueados ou inativados (Bonamino, 2004).

III.4B. IMUNOVIGILÂNCIA NOS SERES HUMANOS

Também em humanos, ocorre a imunovigilância contra o câncer. Em biópsias de tumores removidos cirurgicamente, foram observadas grandes quantidades de linfócitos infiltrantes nos tecidos tumorais. Estas células são conhecidas como linfócitos infiltrantes de tumores (TIL) e há trabalhos que associam os níveis de TIL à sobrevivência dos pacientes portadores de tumores como o melanoma (Clark, 1989). Resultados similares foram descritos para câncer de mama, bexiga, cólon, próstata, ovário, reto ou neuroblastoma. Alguns trabalhos atestaram que as células associadas ao prognóstico eram os linfócitos T CD8⁺ (Bonamino, 2004).

III.4C. IMUNO-EDIÇÃO DO CÂNCER

Com os novos conhecimentos sobre a biologia dos tumores e suas interações com o sistema imunológico ficou claro que o papel do sistema imunológico não pode ser definido simplesmente como imunovigilância. Na verdade, o sistema imunológico não só realiza uma vigilância sobre o surgimento dos tumores, como também exerce uma atividade de esculpir o perfil dos tumores que escapam ao seu controle. Desta forma, foi proposto o termo “imunoedição do câncer” para descrever o complexo processo de interações entre o tumor e o sistema imunológico (Dunn, 2002).

No processo de imunoedição, o sistema imunológico pode eliminar completamente certos tumores, gerar um estado não-protetor contra alguns tumores ou favorecer o processo de anergia, tolerância ou indiferença contra o tumor. Segundo esta nova proposta, o processo de imunoedição do câncer envolveria três etapas: eliminação das células tumorais, equilíbrio com os clones remanescentes e, por fim, o escape imunológico por parte do tumor.

Neste modelo, o processo de imunovigilância ocorre na primeira etapa, onde a maioria das células tumorais é eliminada pelo sistema imunológico. A etapa que compreende o equilíbrio leva a uma seleção de caráter darwiniano de subclones tumorais enquanto um estado de equilíbrio entre o tumor e a imunovigilância é atingido. Este estado de equilíbrio é provavelmente a etapa mais lenta de todo o processo de evolução tumoral, permitindo a geração de um grande número de subclones com grande variabilidade. O surgimento de subclones com características que permitem escapar do controle imunológico leva à expansão destes clones. Desta forma, o equilíbrio é quebrado e o tumor supera em grande medida o efeito regulatório do sistema imunológico.

O modelo apresentado por Dunn e colaboradores atesta que em um primeiro momento, células tumorais se expandiriam até se tornarem invasivas. A pressão física da massa de células neoplásicas levaria à secreção de citocinas pró-inflamatórias que serviriam como quimioatrativo para componentes do sistema imunológico (como células NK, linfócitos T, macrófagos e células dendríticas imaturas). Os linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) reconheceriam as células tumorais, passando a secretar IFN- γ (Diefenbach, 2001). Esta citocina, por sua vez, pode induzir a morte celular de

parte do tumor por vias anti-proliferativas (Bromberg, 1996) ou pró-apoptóticas (Kumar, 1997). Além do efeito direto sobre células tumorais, o IFN- γ induz também a secreção pelas células tumorais e pelo tecido adjacente de várias quimiocinas (Cole, 1998). Além do efeito quimioatrativo, algumas destas citocinas são capazes de reduzir a neovascularização que é necessária à expansão da massa tumoral, gerando assim mais morte no tumor (Sgadari, 1996). A crescente secreção de citocinas e quimiocinas no ambiente tumoral leva a um crescente recrutamento de células NK e macrófagos. Estas células são ativadas no microambiente tumoral quando encontram IFN- γ e IL-12, induzindo ampla morte celular no tumor através da utilização de mecanismos como ligantes da família TNF, utilização de grânulos de perforina e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Trinchieri, 1995; Ikeda, 2002).

Neste microambiente tumoral, detritos celulares decorrentes da morte tumoral são capturados por células fagocíticas profissionais como as células dendríticas (DC). Estas células, uma vez que recebem estímulos maturativos decorrentes da produção de citocinas no ambiente formado pelo tumor infiltrado por linfócitos citotóxicos, migram para linfonodos drenantes proximais. No linfonodo, estas DC induzem o *priming* (apresentação do antígeno) e a reativação de células responsivas aos antígenos tumorais. Estes linfócitos ativados pelas DC são de natureza CD4+, que produzem IFN- γ (Th1), e CD8+. A geração de células CD4+ “helper” de perfil Th1 ajuda na geração de células CD8+ citotóxicas (Pardoll, 2002). Estas células que sofreram o processo de *priming* ou reativação por parte das DC podem então migrar para o ambiente tumoral, infiltrá-lo e destruir as células tumorais, cuja antigenicidade foi aumentada pela exposição a fatores como o IFN- γ (Shankaran, 2001).

Ao final desta fase caracterizada pela eliminação via citotoxicidade da maioria das células tumorais, entra-se na fase de equilíbrio. Durante este período, as células tumorais são mantidas sob controle numérico via ação direta dos linfócitos infiltrantes (TIL) e pela presença do IFN- γ .

Devido à grande capacidade de mutação das células tumorais, os diferentes clones emergentes adquirem novas características que lhes permitem escapar do forte controle imunológico. Desta forma, o equilíbrio é quebrado e as células proliferam em um ambiente vantajoso, passando a

prevalecer sobre o sistema imunológico. Nesta etapa surgem as manifestações clínicas dos tumores e a evolução da doença sem intervenção leva à morte por falência e comprometimento dos órgãos envolvidos.

Como as células imuno-reativas são capazes de reconhecer clones menos evoluídos, para a obtenção de uma resposta imunológica contra o tumor evoluído e que já desenvolveu o mecanismo de escape, torna-se necessário realizar um novo *priming* em condições normais, *ex-vivo* por exemplo, para desenvolver células contra os potenciais novos antígenos relevantes (Bonamino, 2004). Esta é a proposta da imunoterapia.

III.4D. IMUNOTERAPIA

Células Dendríticas (DC)

As DC representam uma das mais potentes células entre as definidas como APCs (células apresentadoras de antígenos). Durante as respostas imunológicas, as DC desempenham o principal papel como APC atuando como iniciadoras, estimuladoras e reguladoras dos linfócitos T específicos contra os antígenos. As DC ativadas encontradas nos tecidos linfóides são as mais eficientes APCs. No entanto, DCs imaturas (como as encontradas na maioria dos tecidos) não são capazes de estimular respostas eficientes contra os antígenos. Estas células imaturas caracterizam-se por baixos níveis de expressão de moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e de moléculas co-estimulatórias como as da família B.7 (CD80 e CD86), não estando, portanto, completamente aptas para estimularem células T *naïve*.

Dependendo do mecanismo de captura de antígenos pelas DCs (por fagocitose ou através de receptores “específicos”) e do estímulo maturativo concomitante, a natureza da resposta imunológica obtida pode variar amplamente, de tolerogênica a efetora (Mougneau, 2002).

Um dos pontos chave para a utilização de DC em protocolos de imunoterapia de tumores é o conhecimento dos mecanismos de captura de antígenos das DCs, *in vivo*, nos tumores. As DC são capazes de capturar antígenos de células em processos de morte celular bem como de células vivas, sendo capazes de apresentar estes antígenos adquiridos a células T

(Harshyne, 2001). As DC são também capazes de induzir e ativar linfócitos T citotóxicos (CTL) (Chiodoni, 1999)

Apesar das DC promoverem a fagocitose de células em estado apoptótico e apresentarem os antígenos fagocitados às células T, é evidente que um estímulo externo pró-maturativo (como a ligação CD40 - CD40Ligante) é necessário para estimular uma apresentação não tolerogênica dos antígenos capturados por este processo (Propato, 2001). Fisiologicamente, um dos estímulos mais eficazes de maturação das DC é a interação das moléculas de CD40 (presentes na superfície das DC) com moléculas de CD40L, presentes na superfície de células T ativadas (Castle, 1993).

A apresentação dos antígenos capturados pelas DC ocorre através da degradação intracelular destas estruturas e a “montagem” dos peptídeos resultantes em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade que serão então apresentados na membrana celular durante a interação com as células T potencialmente reativas (Bonamino, 2004).

Ativação e Migração das DC

Uma das principais características das DC ativadas é a capacidade de migrar do local de ativação até órgãos linfóides secundários, onde estas células encontrarão os linfócitos T, podendo assim apresentar os antígenos que estão sendo montados nos complexos de MHC.

Uma vez ativadas, as DC perdem rapidamente a capacidade de capturar e processar antígenos e passam a produzir grandes quantidades de moléculas de MHC de classe I e II, utilizadas na eficiente apresentação do antígeno às células T. Quando nos linfonodos, as DC passam a secretar quimiocinas atrativas de células T e citocinas capazes de estimular ou inibir a resposta imunológica (como IL-12 ou IL-10, respectivamente, por exemplo).

As DC ativadas expressam moléculas de adesão como ICAM-1 (CD54), CD58, CD11c, CD172, CD49d e CD49c; moléculas co-estimulatórias e acessórias tais como B7.1/CD80, B7.2/CD86, CD40 e CD83; e expressam receptores de quimiocinas como CCR7 e CXCR4 (Fontes AM et al, 2006).

Tolerância Periférica:DCs, tumores e imunoterapia

Em indivíduos sãos, acredita-se que os linfócitos auto-reativos que escaparam ao processo de seleção tímica sejam induzidos a um estado de anergia por DC imaturas que apresentam antígenos *self* (Mougneau, 2002). Por este modelo, a baixa expressão de moléculas co-estimulatórias e, sobretudo, a baixa produção de citocinas do tipo indutoras de *priming* IFN- γ , TNF- α , agonistas de toll, IL-1 β e de estimulantes aos linfócitos T levariam estas células a um estado de ativação parcial.

Acredita-se que a produção de IL-10 por parte de alguns tumores possa ser um dos mecanismos de indução de anergia no sistema imunológico. Já foi demonstrado que DC imaturas, quando tratadas com IL-10, inibem a expressão de MHC e das moléculas co-estimulatórias. Deste modo, estas DCs tornam-se incapazes de estimular células T (Sato, 1999) e acabam por induzir a formação de células T anérgicas (Sato, 2002).

No entanto, na presença de um estímulo pró-maturativo (ativação do CD40 na membrana das DC), a resposta tolerogênica se transforma em uma resposta antígeno-específica funcional, com expansão das células T responsivas e secreção de citocinas pró-inflamatórias (Liu, 2002). Vários experimentos já mostraram ser possível manipular a resposta mediada por DC para a obtenção de células T responsivas contra um antígeno de interesse, como os antígenos associados aos tumores (Bonamino, 2004).

A molécula CD40

A molécula CD40 foi identificada em 1985 como uma molécula expressa durante todos os estágios do desenvolvimento e diferenciação de células B, tendo seu cDNA isolado de uma biblioteca de expressão da linhagem celular de linfoma de Burkitt Raji (Stamenkovic, 1989). O gene do antígeno CD40 humano foi mapeado no cromossomo 20; sua proteína é uma glicoproteína fosforilada de aproximadamente 48 kDa.

Estudos posteriores demonstraram que a expressão desta molécula é, na verdade, muito mais extensa do que inicialmente se imaginava. Nas células B, a ativação via CD40 gerada pela interação com CD40L leva à proliferação, diferenciação e produção de imunoglobulinas tanto nas células B imaturas quanto nas maduras. Os linfócitos B ativados via CD40 apresentam uma

expressão aumentada de uma série de proteínas tais como as citocinas IL-6, IL-10, TNF, moléculas de adesão e co-estimulatórias como ICAM, CD23, B7.1/CD80, B7.2/CD86 e um aumento na expressão de MHC de classe I e II (Khanna, 1997).

A molécula de CD40 é também expressa por monócitos e DCs. Nestas células, a ativação via CD40 resulta em : (1) aumentada sobrevivência das células, (2) secreção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF e enzimas como a metaloproteinase de matriz (MMP), (3) ação tumoricida aumentada de monócitos e (4) síntese de óxido nítrico (Van Kooten, 2000). Além desses efeitos, este tipo de ativação muda o perfil fenotípico das DCs, tornando-as mais eficientes como APCs através do aumento de expressão de moléculas de adesão e co-estimulatórias como CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3, CD80/B7.1, CD86/B7.2 e o marcador de maturação CD83.

A interação entre as moléculas CD40 presentes nas membranas das DCs e as moléculas CD40L das células T é de vital importância para o *priming* de células T e à indução da maturação das DCs, sendo considerado um dos mais potentes estímulos maturativos. Como consequência desta ativação das DCs, células CD8⁺ podem ser induzidas a uma ativação funcional, assim como células CD4 *naïve* podem ser induzidas a um fenotipo Th1. A cinética e a duração da expressão de CD40L nas células T CD4⁺ são reguladas por sinais co-estimulatórios e citocinas como IL-2, IL-12, IL-15, IFN- γ e TGF- β (Watanabe S et al, 2003).

Em alguns modelos animais de tumor, anticorpos capazes de estimular via CD40 foram usados resultando em regressão de tumores estabelecidos (French, 1999; Diehl, 1999; Sotomayor, 1999). Murugaiyan e colaboradores demonstraram, *in vivo*, que a resposta anti-tumoral das células T é modulada em função dos níveis de expressão de CD40; camundongos com altos níveis de expressão CD40 apresentaram resposta anti-tumoral mais eficaz, dada por maior resposta dos linfócitos T citotóxicos (CTL) e maior produção de IFN- γ . Quanto menor a expressão de CD40 nos camundongos, menor a produção de IL-12 e TNF- α , mas maior é a produção de IL-10.

Diferentes níveis de expressão de CD40 podem alterar a resposta das células T por pelo menos, dois mecanismos distintos. Primeiro, a sinalização

via CD40 melhora o processamento e apresentação de antígenos. Segundo, há diferentes níveis de produção de IL-12 e IL-10 (IL-12>IL-10). Também, há a hipótese de que a sinalização via CD40 poderia aumentar a expressão de CD80 e CD86. Todos estes mecanismos tornam as células T mais eficazes na resposta anti-tumoral (Murugaiyan G et al, 2007).

O estímulo via CD40 induz a migração das Dcs para os tecidos linfóides secundários por aumentar a expressão de CCR7. Fujita e colaboradores mostraram que vacinação com células tumorais modificadas para expressar CD40L, exibiram eficácia terapêutica contra metástases estabelecidas em diferentes órgãos. Acredita-se que os órgãos linfóides secundários sejam os únicos locais onde ocorra o “*priming*” (ativação) das células T *naïve*. Portanto, o início da resposta imune celular depende da capacidade migratória das DCs (Watanabe S et al, 2003).

Esses resultados abriram novas perspectivas para o campo da imunoterapia aplicada a tumores.

III.5. ESPECIFICIDADE

III.5.1. PROMOTOR ESPECÍFICO

O emprego de promotores célula-específicos é uma prática capaz de reduzir efeitos colaterais em terapia gênica por limitar a expressão dos genes ao tecido-alvo. O gene CALC-I é predominantemente expresso nas células C tireoidianas, induzindo uma alta produção de calcitonina (CT). Este gene também se expressa nas células neuronais, resultando na secreção de CGRP (“calcitonin gene-related peptide”) por digestão (“splicing”) alternativa do RNA mensageiro.

Messina et al, em 2000, aumentaram a eficiência e a especificidade do promotor natural CALC-I construindo uma sequência quimérica de sequências ativadoras “enhancers” e um promotor mínimo. Desta forma, obtiveram um promotor de calcitonina modificado (TCP) mais forte e mais específico que o promotor de calcitonina natural CT/CGRP.

Vários trabalhos de terapia gênica em carcinoma medular de tireóide, *in vitro* e *in vivo*, já utilizaram o promotor da calcitonina modificado (TCP) de

Messina et al. Yamasaki et al, em 2002, demonstraram que o promotor TCP é funcional em tumores medulares de tireóide de ratos WAG/Rij com pouca atividade em órgãos não-alvo, após a injeção intratumoral ou intraperitoneal dos adenovírus terapêuticos (AdTCPmIL-12: adenovírus com o gene da interleucina 12 murina, sob controle do promotor TCP).

Outros pesquisadores também empregaram este promotor: Minemura et al, em 2002, utilizando AdTCPtk (adenovírus com o gene da timidina quinase, sob controle do promotor TCP); Drosten et al, em 2002-2003, utilizando adenovírus com o gene do RET mutante dominante-negativo, sob controle do promotor TCP; Messina et al, em 2003, utilizando adenovírus com o gene PNP, um sistema suicida, sob controle do promotor TCP e Cengic et al, em 2005, utilizando adenovírus com o gene do NIS humano, sob controle do TCP.

III.5.2. PEPTÍDIOS SELETIVOS

Peptídeos podem servir como agentes que direcionam o tratamento na terapia gênica especificamente para o tumor. Bockmann et al, 2005, descreveram o peptídeo SRESPHP capaz de se ligar especificamente às células de CMT humanas e murinas, *in vitro* e *in vivo*. A presença deste peptídeo na superfície de um vetor, garante que este vetor se direcione apenas para células de CMT. O peptídeo SRESPHP não só se liga às células de CMT, mas também é internalizado por elas; o que abre ainda mais possibilidades terapêuticas específicas para o CMT.

III.6. A ESCOLHA DOS GENES TERAPÊUTICOS: TIMIDINA QUINASE E INTERLEUCINA 12 OTIMIZADA

O primeiro sistema suicida (GDEPT) em terapia gênica descrito foi o do gene da timidina quinase (HSV/tk) em combinação com a pró-droga ganciclovir. Há mais de quinze anos um grande número de experimentos vem sendo feitos com este sistema, para diferentes tipos de tumor e em vários modelos animais. Como diversos resultados encorajadores foram obtidos, estudos clínicos em humanos vem sendo desenvolvidos (Fillat et al, 2003).

Um dos principais fatores limitantes de sucesso na terapia gênica é a baixa eficiência de transfecção. Devido ao efeito *bystander*, o sistema suicida

HSV/tk-GCV é capaz de promover completa erradicação do tumor, mesmo sem haver alta porcentagem de células transfectadas *in vivo* (Dillen et al, 2002).

Outra vantagem do sistema suicida HSV/tk-GCV é que não é necessário que o gene HSV/tk se expresse por muito tempo. Uma freqüente dificuldade na terapia gênica é conseguir uma expressão gênica por tempo prolongado. Neste sistema suicida, alcança-se o objetivo do tratamento que é a apoptose das células cancerosas pela ativação com ganciclovir (GCV), mesmo que a expressão gênica ocorra por um curto período de tempo (Marconi et al, 2000).

No processo de tumorigênese, somam-se várias mutações; ou seja, existem múltiplas alterações em genes, proteínas, receptores e fatores de transcrição. Nem sempre a correção de um defeito, transforma uma célula tumoral em célula normal. Por exemplo, a ribozima utilizada no trabalho de Parthasaraty et al é específica para CMT com mutação no proto-oncogene RET no códon 634 mas não para CMTs que apresentam mutações em outros códons. Já na terapia gênica suicida com HSV/tk-GCV, ocorre destruição das células tumorais, independente de quais sejam sua(s) mutação(ões).

A associação de tratamentos convencionais para o CMT, como quimioterapia e radioterapia, com terapia gênica suicida vem sendo testada (Vassaux et al, 2004). Nishihara et al, 1997, já publicaram que a timidina quinase torna o tumor radio-sensível *in vitro* e *in vivo* (animais).

Dentre as mais promissoras estratégias de terapia gênica aplicadas ao câncer e utilizadas no presente estudo, figura o sistema suicida timidina quinase/ ganciclovir, associado ao emprego de citocinas, uma associação sabidamente sinérgica. Além das interleucinas em conjunto com HSV-tk/GCV estimularem o sistema imunológico contra as células tumorais, elas ainda conferem memória imunológica contra recidivas (DeGroot et al, 2001).

De fato, analisando os resultados dos trabalhos de Terapia Gênica para CMT, os melhores resultados surgiram quando houve associação de dois métodos anti-tumorais sinérgicos: sistema suicida HSV-tk/GCV e ativação da resposta imunológica. Na tabela 3 estão descritos esses resultados que nos levam facilmente à conclusão de que as citocinas (principalmente a IL-12) são superiores à timidina quinase e a associação citocina - timidina quinase é a melhor combinação. Fica claro que animais que receberam adenovírus com

gene de citocina, adquirem memória imunológica. A tabela 4 compara resultados dos genes terapêuticos timidina quinase, IL-2 e IL-12 em CMT em animais.

Levando-se em consideração que a interleucina otimizada confere uma resposta imune bastante superior em comparação à IL-12 humana (Leong et al, 2003), o emprego desta interleucina neste novo vetor traz a esperança de resultados ainda mais positivos que os publicados com a interleucina 12 murina (Zhang & DeGroot, 2000b; Yamasaki et al, 2002). Até o presente momento a única interleucina 12 empregada no tratamento de células tumorais medulares humanas foi a murina.

Tabela 4. Protocolos de terapia gênica em CMT, *in vivo*.

Adenovírus	Grupo 1 “curados” (ratos que ficaram livre de doença)	Grupo 2 “sem doença” (ratos que permaneceram sem doença)
Ad CMV Luc (Zhang & DeGroot, 2001b)	0/21 (0%)	
Ad CMV tk (Zhang & DeGroot, 2001b)	2/17 (12%)	
Ad CMV hIL-2 (Zhang & DeGroot, 2001b)	13/34 (38%)	
Ad CMV tk hIL-2 (Zhang & DeGroot, 2001b)	19/30 (63%)	15/19 (79%)
Ad CMV mL-12 (Zhang & DeGroot, 2000b)	43/50 (86%)	10/10 (100%)
Ad TCP mL-12 (Yamasaki et al, 2002)	5/8 (62,5%)	5/5 (100%)
Ad CMV tk + Ad CMV hIL-2 (Zhang & DeGroot, 2001b)	Não houve benefício com a injeção da mistura dos dois adenovírus; dados não mostrados (Zhang & DeGroot, 2001b).	

Grupo 1: Ratos WAG/Rij portadores de carcinoma medular de tireóide que foram tratados por injeção com o adenovírus. **Grupo2:** São os ratos do grupo 1 que ficaram curados após receber a injeção com o adenovírus terapêutico, e que foram re-inoculados com células tumorais de carcinoma medular. **Promotores:** **CMV** (citomegalovírus), **TCP**; **Genes:** **Luc** (luciferase), **tk** (timidina quinase), IL-2 ou IL-12 humana ou murina.

III.7. A ESCOLHA DO PROMOTOR

O promotor da calcitonina limita a ação do vetor somente às células parafoliculares promovendo assim, uma terapia gênica específica, de baixa toxicidade, e segura. Foi escolhido o promotor TSE2.CP1 (TCP), o promotor da calcitonina modificado por Messina et al, 2000, pois com este promotor são alcançados maiores níveis de transcrição que com o promotor natural da calcitonina e maior especificidade. Outros pesquisadores já publicaram trabalhos empregando este promotor (Drosten et al, 2002 e 2003; Yamasaki et al, 2002 e 2004; Cengic et al, 2005).

IV. OBJETIVOS

IV.1. Construção de um vetor (plasmídeo) capaz de destruir células de linhagem de carcinoma medular humano de tireóide, contendo genes HSV-tk (Herpes simplex virus – thymidine kinase) e evIL-12 (gene da interleucina-12 “evolved” otimizada), sob controle do promotor da calcitonina modificado (TCP).

IV.2. Testar a ação dos genes terapêuticos do vetor em culturas de células humanas de carcinoma medular de tireóide.

- Verificar se houve apoptose das células transfectadas pelo sistema suicida HSV-tk/ganciclovir.
- Verificar a ação da IL-12 “evolved” secretada pelas células transfectadas, através de ensaio de proliferação linfocitária e de estímulo a células dendríticas.

IV.3. Testar a especificidade do sistema. Avaliar em quais linhagens celulares ocorre expressão gênica, sob o controle do promotor TCP.

V. MATERIAIS E MÉTODOS

V.1- LINHAGENS E PLASMÍDIOS

1.1- Linhagens bacterianas:

Escherichia coli JM109 (Sambrook *et al.*, 1989)

1.2- Linhagens celulares:

Células TT: células humanas de carcinoma medular de tireóide (Número CRL-1803 ATCC – American Type Culture Collection - Rockville, MD, USA). Contém uma mutação do proto-oncogene RET no códon 634 (TGC→TGG); de NEM 2A. Gentilmente cedidas por Dra. Edna Kimura (Instituto de Ciências Biomédicas I, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP).

Células HEK 293: células embrionárias renais humanas.

1.3- Plasmídios:

As figuras dos plasmídios (Figura 6 a 19) encontram-se no Apêndice (IX.1. Plasmídios). Estão representados apenas os sítios de restrição que tiveram relevância nos planos de clonagem.

1.2.1. pBS-tk: Plasmídio BlueScript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA) contendo o gene timidina quinase tipo 1 do Herpes simplex (gentilmente cedido pelo Dr. LJ DeGroot, Brown University, Providence, R.I.) (Figura 6).

1.2.2. pTCPmIL-12: Plasmídio pΔE1sp1B (Microbix, Toronto, Ontário, Canadá), contendo os cassetes de expressão: promotor da calcitonina modificado - subunidade 35 da interleucina 12 murina e promotor da calcitonina modificado - subunidade 40 da interleucina 12 murina (gentilmente cedido pelo Dr. LJ DeGroot, Brown University, Providence, R.I.) (Figura 7).

1.2.3. pGL3 basic e pGL3 control: Plasmídios (Promega, Madison, WI), contendo o gene da luciferase *firefly* (gentilmente cedidos pelo Dr. Chin Jin Lia, Endocrinologia, FMUSP, São Paulo, S.P.) (Figura 8).

1.2.4. pcDNAev35: plasmídio pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo a subunidade 35 da interleucina 12 otimizada (Leong *et al* 2003) (gentilmente cedido por Dr. Punonnen, Maxygen, Redwood City, CA)(Figura 9).

1.2.5. pcDNAev40: plasmídio pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo a subunidade 40 da interleucina 12 otimizada (Leong *et al* 2003) (gentilmente cedido pelo Dr. Punonnen) (Figura 10).

1.2.6. Plasmídio pCR2.1-TOPO: Invitrogen, Carlsbad, CA (Figura 11).

Plasmídios construídos neste trabalho:

1.2.7. pTCP: Plasmídio pΔE1sp1B (Microbix, Toronto, Ontário, Canadá) contendo unicamente o promotor da calcitonina modificado (TCP) (Figura 12).

1.2.8. pTCPtk: Plasmídio pΔE1sp1B (Microbix) contendo o cassete de expressão promotor da calcitonina modificado (TCP) – gene da timidina quinase tipo 1 do Herpes simplex (tk) (Figura 13).

1.2.9. pTCPev35: Plasmídio pΔE1sp1B (Microbix) contendo o cassete de expressão promotor da calcitonina modificado (TCP) – subunidade 35 da interleucina 12 otimizada (Figura 14).

1.2.10. TOPO-ev40: Plasmídio pCR2.-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo a subunidade 40 da interleucina 12 otimizada (Figura 15).

1.2.11. pTCPev40: Plasmídio pΔE1sp1B (Microbix) contendo o cassete de expressão promotor da calcitonina modificado (TCP) – subunidade 40 da interleucina 12 otimizada (Figura 16).

1.2.12. pTCPev40tk: Plasmídio pΔE1sp1B (Microbix) contendo os cassetes de expressão: promotor da calcitonina modificado (TCP) – subunidade 40 da interleucina 12 otimizada e promotor da calcitonina modificado (TCP) – gene da timidina quinase tipo 1 do Herpes simplex (tk) (Figura 17).

1.2.13. pTCPevIL-12tk: Plasmídio pΔE1sp1B (Microbix) contendo três cassetes de expressão: 1. promotor da calcitonina modificado (TCP) – subunidade 35 da interleucina 12 otimizada; 2. promotor da calcitonina modificado (TCP) – subunidade 40 da interleucina 12 otimizada; 3. promotor da calcitonina modificado (TCP) – gene da timidina quinase tipo 1 do Herpes simplex (tk) (Figura 18).

1.2.14. pTCPLuc: Plasmídio pΔE1sp1B (Microbix), contendo o cassete de expressão promotor da calcitonina modificado (TCP) – gene da luciferase *firefly* (Figura 19).

V.2- MEIOS DE CULTURA

2.1- CULTIVO DE BACTÉRIAS

Os meios sólidos utilizados para o cultivo de bactérias foram idênticos ao meio líquido LB, somente acrescidos de 2% de ágar-ágar (Miller, 1972).

Os meios de cultura foram, previamente, autoclavados a 120°C por 20 minutos.

As bactérias foram semeadas em placas contendo meio sólido e incubadas em estufa a 37°C durante 16 horas. Culturas de células em meio líquido foram realizadas com aeração, por agitação, em incubadora “New Brunswick Scientific”, a 125 rpm e 37°C.

Todos os meios de cultura, utilizados neste trabalho, foram de procedência do laboratório “Difco” ou “Merck” e foram preparados conforme Sambrook *et al.*, 1989. A

composição dos meios de cultura empregados encontra-se no Apêndice (IX.2. Meios de Cultura).

2.2- CULTURA DE CÉLULAS

As células TT foram cultivadas em meio Ham F12K (Gibco) e as células HEK 293 em meio DMEM (Gibco). Estes meios foram suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco) e com 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

V.3- SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas conforme Sambrook *et al.*, 1989; as composições das soluções empregadas encontram-se no Apêndice (IX.3. Soluções).

V.4- TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS

Foi empregado o método de transformação por cloreto de cálcio apenas para as clonagens de fragmentos de PCR com o estojo TOPO TA Cloning (Invitrogen, Carlsbad, CA), empregando-se células *E.coli* competentes comerciais “Transforming one shot component *E. coli* cells” segundo o protocolo sugerido pelo fabricante. Para todas as outras clonagens, utilizou-se o método de eletroporação.

TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS POR ELETROPORAÇÃO

A- PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS

Um litro de meio LB foi inoculado com 10 mL de uma cultura de *E. coli* JM109, previamente crescida por 16 horas e incubada a 37°C, com uma agitação de 100 rpm, até apresentar Ab₆₀₀ entre 0,5 a 0,8. As células foram sedimentadas, por centrifugação em rotor gelado, por 6 minutos, a 4.500g, e ressuspensas em 1L de água destilada estéril a 4°C. A seguir, as células foram novamente sedimentadas em rotor gelado, centrifugando-se por 10 minutos, a 4.500 g e ressuspensas em 500 mL de água destilada estéril, a 4°C. Centrifugou-se novamente, nas mesmas condições, para posteriormente ressuspender o sedimento em 20 mL de água destilada estéril, a 4°C. Finalmente, a suspensão de células foi centrifugada durante 10 minutos, a 4.500 g, a 4°C, ressuspensa em glicerol 10% a 4°C num volume final de 2 a 3 mL e fracionada em alíquotas de 40 µL em tubo "eppendorf". Estes tubos foram estocados a -80°C.

B- ELETRO-TRANSFORMAÇÃO

Para cada transformação, uma alíquota de 40 μ L de células competentes foi descongelada, incubando-se em gelo, e adicionou-se de 1 a 2 μ L de DNA plasmidial (40ng/ μ L). Esta mistura foi incubada em gelo por 1 minuto e posteriormente transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada. O pulso elétrico foi aplicado com o aparelho de eletroporação "Multiporator Eppendorf" calibrado para U 1700 V, τ 5,0 ms, modo procariota. Logo após a aplicação do pulso elétrico, as células foram imediatamente ressuspensas em 1 mL de meio SOC, transferidas para um tubo Falcon de 50 mL e incubadas durante 1 hora e 15 minutos, a 37°C, com agitação de 125 a 150 rpm. Finalmente, as células foram semeadas em placas contendo meio seletivo LB ágar-AP.

V.5- EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO

5.1- EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO - "MIDI-PREP"

A extração foi realizada de acordo com o protocolo do Wizard Plus Midipreps; DNA Purification System. Promega, Madison, WI.

5.2. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO - "MINI-PREP"

A extração foi realizada segundo Sambrook *et al.*, Vol 1, pág. 1.25 (1989), modificado. Foram inoculados 3 mL de meio LB-AP com uma colônia bacteriana hospedeira do plasmídio desejado. A cultura foi crescida com aeração produzida por agitação de 125 rpm, a 37°C, durante 16 horas e centrifugada por 45 segundos, a 12.000 rpm. As células foram ressuspensas em 0,3 mL de Solução I e incubadas 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, 0,3 mL de solução II foram adicionados e, após a incubação a 4°C por 10 minutos, prosseguiu-se a adição de 0,3 mL de solução III, seguida de incubação por 45 minutos a 4°C. Após nova centrifugação a 12.000 rpm, por 20 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubo "eppendorf" e adicionou-se 0,6 mL de clorofórmio:isoamílico 25:1. Após agitação do tubo, centrifugou-se por 1 min e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Foram adicionados 0,8 volumes de isoprpanol, incubou-se por 40 minutos a 4°C e seguiu centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos, a 4°C. Após descartar o sobrenadante, foi adicionado 0,1 mL de etanol 80%. Seguiu-se centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o DNA foi secado e dissolvido em 50 μ L de água estéril.

V.6- TRATAMENTO DO DNA COM ENZIMAS

6.1- TRATAMENTO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As enzimas de restrição utilizadas foram fornecidas pelos laboratórios "New England Biolabs, Beverly, MA" ou "Promega, Madison, WI" ou "Invitrogen, Carlsbad, CA". As enzimas de restrição que foram utilizadas estão citadas em V.13- Clonagens: Construção dos Plasmídios. Os sistemas de digestão foram montados seguindo as recomendações dos fabricantes.

6.2- TRATAMENTO DO DNA COM O FRAGMENTO "KLENOW" DA ENZIMA DNA POLIMERASE I DE *E. coli*.

Utilizou-se o fragmento "Klenow" da enzima DNA polimerase I de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) para preencher as extremidades coesivas dos plasmídios com os nucleotídeos necessários para se obter extremidades abruptas. Para a sua utilização, seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Todo fragmento tratado com Klenow DNA polimerase foi precipitado para sua posterior utilização nas reações de ligação.

6.3- REAÇÃO DE LIGAÇÃO

A reação de ligação entre vetor-inserto foi feita segundo o protocolo do fabricante da T4 DNA ligase "High concentration" (Invitrogen, Carlsbad, CA). O sistema de ligação foi montado para um volume final de 20uL, em uma proporção vetor/inserto de 1:30, 1uL de ligase, 4uL de tampão 5X. A reação foi incubada a 16 °C, 24 horas.

V.7- PURIFICAÇÃO DE DNA

7.1- PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO "KIT" COMERCIAL

Realizada de acordo com o protocolo do "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" – Purification of DNA from solution - do laboratório Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA) segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

7.2- PURIFICAÇÃO DE DNA EM SOLUÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

Foram adicionados 10% de solução III e 2 volumes de etanol absoluto e feita uma incubação a 4°C, por 1 hora. A seguir, procedeu-se a centrifugação a 12.000

rpm, por 40 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e 100 µl de etanol 80% foi adicionado. Seguiu-se centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco em aparelho de vácuo (Eppendorf concentrator 5301) e dissolvido em água.

V.8- ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Em várias etapas do trabalho foi necessário analisar o DNA quanto às características físicas, tais como: integridade, pureza, conformação e tamanho molecular. Estes dados foram obtidos através de análise dos perfis de migração dos fragmentos de DNA em géis de agarose (Sigma tipo II), submetidos à eletroforese. A concentração de agarose dos géis variou de 0,7% a 1%, dependendo do experimento e todos continham 10 µg/ml de brometo de etídio para visualizar o DNA sob luz U.V. Como padrão de tamanho molecular foi utilizado Ladder 1 Kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA). O tampão de corrida utilizado foi TAE 1X.

V.9- ELUIÇÃO DE DNA DE GEL DE AGAROSE

ELUIÇÃO DE DNA DE GEL DE AGAROSE LOW-MELTING 0,8% POR GELO SECO

Ausubel *et al.*, pág. 2-17 (1992), modificado

Após a separação eletroforética dos fragmentos de DNA em gel de agarose, cortou-se a(s) banda(s) de interesse com estilete estéril. Esta etapa foi monitorada visualmente iluminando o gel com um transiluminador manual de U.V.

Fragmentos do gel de agarose contendo a banda de interesse foram colocados em um tubo "eppendorf", que ficou aquecendo a 65°C até tornar a agarose líquida. Em alguns casos, foi necessário adicionar 0,1 ml de TAE 1x para facilitar o processo. Com a agarose completamente líquida, os tubos foram colocados em nitrogênio líquido, por 5 minutos. Seguiu-se incubação a 37°C, por 5 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo. Repetiu-se o processo: agarose residual com adição de TAE 1x a 65 °C, incubação por 5 minutos em nitrogênio líquido, incubação a 37°C por 5 minutos e centrifugação a 12000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para o mesmo tubo no qual já havia o primeiro sobrenadante e finalmente o DNA foi precipitado (V.7. Purificação de DNA – 7.2. Purificação de DNA em solução por precipitação).

V.10- REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA (PCR) (ANEXO 4)

A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi realizada no Termo Ciclador 480 (Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, CT), com 25µl de reação contendo 0,2µg de DNA plasmidial, 50mM KCl, 2mM Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 12,5 pmol de cada iniciador e 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os iniciadores utilizados foram: T7”promoter/primer binding site” senso e pcDNA3.1/BGH reverso (Invitrogen, Carlsbad, CA). As amplificações foram feitas após denaturação inicial a 95°C por 8 minutos, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C e extensão final de 10 min a 72°C.

V.11- CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE PCR

Fragmentos de PCR contendo o gene *ev40* foram amplificados a partir do pcDNA*ev40* e clonados no vetor pCR2.1-TOPO utilizando o *kit* comercial “TOPO TA Cloning Kit” (Invitrogen, Carlsbad, CA). O vetor recombinante foi transformado em células *E.coli* “Transforming one shot component *E. coli* cells” (Invitrogen, Carlsbad, CA), conforme protocolo do fabricante (Anexo 4).

V.12- SEQÜENCIAMENTO

Os plasmídios recombinantes obtidos após a clonagem no vetor TOPO (TOPO*ev40*) foram seqüenciados no equipamento ABI 377 (Applied Biosystems), empregando-se o estojo *DNA Sequencing Big Dye Terminator v 3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). Foram utilizados os iniciadores promotor de T7 e M13 F(-20) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Também foram seqüenciados os plasmídios pTCP_{tk}evIL-12 e pTCP_{Luc}; os primers utilizados estão em Apêndice (IX.4).

V.13- CLONAGENS: CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIOS

Na primeira etapa do trabalho foi feito o mapa de restrição dos diferentes plasmídios para elaborar os planos de clonagem.

Primeiramente, foi necessária a construção do plasmídio pTCP, pois este plasmídio serviria de base para construir os três cassetes de expressão desejados: 1. TCP – gene da timidina quinase tipo 1 (HSV-tk) – PA; 2. TCP – subunidade 35 do gene da interleucina 12 otimizada (*ev 35*) – PA; 3. TCP - subunidade 40 do gene da interleucina 12 otimizada (*ev 40*) – PA. e o plasmídio final pTCP_{tk}evIL-12 contendo estes três cassetes de expressão .

No plasmídio pTCP também foi clonado o gene da luciferase, para originar o plasmídio pTCP_{Luc}.

Nas eletroforeses em gel de agarose foram empregados os marcadores de peso molecular *ladder* 1Kb plus ou 1Kb DNA *ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Figura 20)

Figura 20: Marcadores de peso molecular: 1Kb plus e 1Kb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA)

1. Construção do plasmídio pTCP (Anexo 1)

Foi feita digestão com a enzima de restrição *EcoRI* do plasmídio pTCPmIL-12 (Figura 21). Seguiu-se a eluição do gel de agarose do fragmento de peso molecular de 6,8 kb, e posterior re-ligação.

Figura 21. Gel de agarose 0,8%

1. Ladder 1 kb ;
2. pTCPmIL-12 não digerido;
3. pTCPmIL-12 *EcoRI*

2. Construção do plasmídio pTCPtk (Anexo 2)

O gene da timidina quinase contido no plasmídio BlueScriptSK+(Stratagene, La Jolla, CA) foi isolado através de dupla digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI* (Figura 22) e posterior eluição do gel de agarose (inserto).

Figura 22. Gel agarose 0,8%

- 1.Ladder 1 kb plus
- 2.pBStk não digerido
- 3.pBStk *BamHI/XhoI*
- 4.Ladder 1 kb plus

← 1,8Kb

O plasmídio pTCP foi linearizado com a enzima de restrição *EcoRI* (vetor).

Tanto vetor quanto inserto foram tratados com enzima Klenow DNA polimerase e empregados na reação de ligação.

A bactéria JM109 foi transformada por eletroporação.

Todas as colônias obtidas foram analisadas através de extração de DNA por “mini-prep” e eletroforese em gel de agarose, para identificar o plasmídio de maior peso molecular (Figura 23).

Figura 23. Gel agarose 0,8%

17 e 29: Clones com maior peso molecular.

Foi feita, posteriormente, análise de restrição com as enzimas *Clal*; *BamHI* e *SmaI*, obtendo-se fragmentos de tamanho esperado, confirmando a construção do plasmídio pTCPtk, com o gene tk inserido no sentido certo (Figuras 24, 25).

Figura 24. Gel de agarose 0,8%

1. pTCPtk não digerido
2. pTCPtk *Clal*
3. pTCPtk *SmaI*
4. Ladder 1 kb plus

Figura 25. Gel de agarose 0,8%

1. Ladder 1 kb plus
2. pTCPtk não digerido
3. pTCPtk *BamHI*

3. Construção do pTCPev35 (Anexo 3)

O gene da subunidade 35 da interleucina 12 otimizada (ev 35) foi isolado do plasmídio pcDNAevp35 por digestão com as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI* e eluição do gel de agarose do fragmento de peso molecular de 650 pb, fragmento contendo o gene ev35 (Figura 26).

Figura 26. Gel de agarose 0,8%(DNA ladder 1 Kb plus)

O plasmídio pTCP foi linearizado com a enzima de restrição *EcoRI* (vetor).

Vetor e inserto foram tratados com a enzima Klenow e a seguir foi feita reação de ligação.

A bactéria JM109 foi transformada com a mistura de ligação pelo método de eletroporação.

Todas as colônias obtidas com a eletroporação foram analisadas através de extração de DNA por “mini-prep” e eletroforese em gel de agarose para identificar o plasmídeo de maior peso molecular (Figura 27).

Figura 27. 22: Ladder 1Kb plus; 32, 35 e 43: clones com maior peso molecular

Foi feita análise de restrição com as enzimas *Bgl*II; *Xba*I; *Hind*III; *Hind*III/*Cl*aI, obtendo-se fragmentos de: 0,4; 0,5 Kb; e 1,1 kb respectivamente; confirmando a construção do plasmídeo pTCPev35, com o gene ev35 inserido no sentido certo (Figuras 28, 29).

Figura 28. Gel agarose 0,8%

1. Ladder 1 kb plus
2. pTCPev35 não digerido
- 3 a 5. pTCPev35 *Bgl*II
- 6 a 8. pTCPev35 *Xba*I

Figura 29. Gel agarose 0,8%
1. pTCPev35 *Hind*III/*Cl*aI
2. Ladder 1 kb plus

4. Construção do plasmídeo pTCPev40 (Anexos 4 e 5)

O gene da subunidade 40 da interleucina 12 otimizada, presente no plasmídeo pcDNAev40 foi isolada através da amplificação por PCR empregando-se iniciadores específicos (Anexo 4) (Figura 30). O fragmento contendo o gene ev40 foi clonado no vetor TOPO, utilizando o estojo TOPO TA Cloning (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Figura 30. Gel de agarose 0,8%
1.Ladder 1 kb plus
2.PCR do gene ev 40

Posteriormente, foi confirmada a seqüência do gene ev40 através de seqüenciamento .

Após digestão do plasmídio TOPOev40 com *EcoRI* o fragmento de 1Kb contendo o gene ev40 (Figura 31) foi clonado no sítio *EcoRI* do plasmídio pTCP.

Figura 31. Gel de agarose 0,8% (ladder 1 Kb plus)
1. Ladder 1 kb plus ;
2-3-4. TOPOev40 digerido com *EcoRI*.

Todas as colônias obtidas após transformação, foram analisadas através de extração de DNA por “mini-prep” e eletroforese em gel de agarose para identificar o plasmídio de maior peso molecular (Figura 32).

Figura 32. Gel de agarose 0,8%
24. Ladder 1 kb plus
36, 42, 50, 27: clones com maior peso molecular

A construção do plasmídio foi confirmada através de análise de restrição com as enzimas *EcoRI*, *SmaI* e *BglII/ClaI*., obtendo-se fragmentos de tamanho esperado (Figuras 33, 34 e 35).

Figura 33. Gel agarose 0,8%
1. Ladder 1Kb plus;
2;4;6;8: clones não digeridos;
3;5;7;9: clones digeridos com EcoRI .

Figura 34. Gel de agarose 0,8%
1: Ladder 1Kb plus;
2: pTCPev40 não digerido;
3: pTCPev40 / SmaI.

Figura 35. Gel agarose 0,8%
1. Ladder 1 kb plus
2 a 4) pTCTev40 *BglIII/ClaI*

5. Construção do pTCPtkev40 (Anexo 6)

O cassete de expressão TCP-ev40–PA, presente no plasmídio pTCPev40 foi posteriormente clonado no plasmídio pTCPtk.

Para isso, o plasmídio pTCPev40 foi digerido com as enzimas de restrição *ClaI* e *BglII* e o fragmento de 2Kb foi eluído (inserto). O plasmídio pTCPtk foi linearizado por digestão com a enzima de restrição *BglIII*;(vetor) (Figura 36).

Vetor e inserto foram tratados com a enzima Klenow e submetidos a ligação.

Figura 36. Gel de agarose 0,8% (ladder 1 Kb plus)
1: Ladder 1KB plus
2: pTCPTK linear (vetor)
3: Fragmento contendo o cassete de expressão TCP-ev40–PA

Após reação de ligação, foi realizada a transformação da bactéria JM109 pelo método de eletroporação.

Todas as colônias obtidas foram analisadas através de extração de DNA por “mini-prep” e eletroforese em gel de agarose para identificar o plasmídio de maior peso molecular (Figura 37).

Figura 37. Gel de agarose 0,8%
31: Ladder 1Kb plus
10, 21, 29: clones com maior peso molecular.

A confirmação da clonagem foi feita por digestão com as enzimas *EcoRI*, (Figura 38), *Clal*, *HindIII*, *SmaI*, *BglII* e *XbaI* obtendo-se os fragmentos esperados, confirmando a construção do plasmídio pTCPev40 (Figuras 39 e 40).

Figura 38. Gel de agarose 0,8%
1. Ladder 1 kb plus
2. Clone 29 não digerido
3. Clone 29 *EcoRI*

Figura 39. Gel de agarose 0,8%
1. Ladder 1 kb plus
2. pTCPtk ev40 não digerido
3. pTCPtk ev40 *Clal*
4. pTCPtk ev40 *HindIII* (linearizou)
5. pTCPtk ev40 *SmaI*

Figura 40. Gel de agarose 0,8%
1. Ladder 1 kb plus
2. pTCPtk ev40 não digerido
3. pTCPtk ev40 *BglII* (sem digestão)
4. pTCPtk ev40 *XbaI*

6. Construção do pTCPtkevIL12 (Anexo 7)

Esta foi a última clonagem para a construção do plasmídio contendo os três cassetes de expressão TCP-tk-PA; TCP-ev40-PA e TCP-ev35-PA.

O vetor foi o plasmídio pTCPtkev40 e o inserto foi o cassete de expressão TCP-ev35-PA, contido no plasmídio pTCPev35.

O plasmídio pTCPev35 foi digerido com as enzimas de restrição *Clal* e *SmaI*. A seguir realizou-se eluição do gel de agarose do fragmento de peso molecular de 1,5 kb, que continha o cassete de expressão TCP-ev 35-PA (inserto).

O plasmídio pTCPtkev40 foi linearizado com a enzima de restrição *HindIII*(vetor).

Inserto e vetor foram tratados com a enzima Klenow e submetidos a reação de ligação(Figura 41).

Figura 41. Gel de agarose 0,8%

1. Ladder 1 kb plus
2. Fragmento TCP-ev 35-PA (Inserto)
3. pTCPtkev40 tratado com *HindIII* (Vetor)

Após a reação de ligação, foi realizada a transformação da bactéria JM109 pelo método de eletroporação. Todas as colônias obtidas com a eletroporação foram avaliadas através de análise de restrição com a enzima *EcoRI* (Figura 42).

Figura 42. Gel de agarose 0,8%

- 1:ladder 1 Kb plus
- 2: Clone 5 digerido com *EcoRI*

Apenas o clone 5 apresentou padrão de bandas esperado para o plasmídio pTCPtkevIL-12; contendo o cassete TCP-ev35-PA, no sentido certo, conforme

corroborado por posteriores digestões enzimáticas com as enzimas *Clal* e *HindIII* (Figura 43).

Figura 43. Gel de agarose 0,8%
1. Ladder 1 kb plus
2. pTCPtkevlL-12 não digerido
3. pTCPtkevlL-12 *Clal*
4. pTCPEvlL-12 *HindIII* (linear)

7. Construção do pTCPLuc (Anexo 8)

O gene da luciferase *firefly* (Luc) estava contido no plasmídio pGL3 basic (Promega, Madison, WI). Fez-se dupla digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI*. A seguir, realizou-se eluição do gel de agarose do fragmento de peso molecular de 2 kb, contendo o gene Luc (inserto). Também, fez-se dupla digestão com as enzimas de restrição *BglII* e *XhoI* no plasmídio pTCP (vetor).

Após reação de ligação, foi feita a transformação da bactéria JM109 pelo método de eletroporação.

Todas as colônias obtidas foram analisadas por PCR empregando-se iniciadores Pdelta-F e Pdelta-R (Apêndice X.4). O produto amplificado contendo o gene Luc tinha tamanho de 2Kb (Figura 44).

Figura 44. Gel de agarose 0,8%

1 e 18: Ladder 1Kb plus

2,3,4,5,6,8,10,13,14,15,17: Clones cujo produto de PCR apresentou 2kb que corresponde ao gene da luciferase.

7,8,11,12: Clones que amplificaram um fragmento de 500pb que corresponde a plasmídios sem inserto

V.14- TRANSFEÇÃO DE CULTURA DE CÉLULAS

Células HEK 293 foram cultivadas até a confluência de 80%, quando foi feita transfeção pelos métodos do cloreto de cálcio* ou FuGENE (Roche, Indianápolis, IN), com quantidades variáveis dos plasmídios (de 1 a 4 ug) em cada experimento. As células TT foram transfectadas com FuGENE, após confluência de 80% de crescimento seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

* Método de Cloreto de Cálcio: Foram misturados 300µL de HBS 1X e a quantidade desejada do plasmídio. Estas soluções foram agitadas a temperatura ambiente por 30 segundos e logo após, foram adicionados vagarosamente 19,8µL de CaCl₂ 2M em cada tubo durante agitação. Incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente, e todo o volume foi adicionado às placas contendo as células.

V.15- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LUCIFERASE

A atividade da luciferase *firefly* foi quantificada empregando o estojo comercial *Luciferase Assay System* (Promega, Madison, WI), conforme orientações do fabricante. As células que haviam sido transfectadas com os plasmídios pGL3 basic; pGL3control ou pTCPLuc foram lisadas para leitura no luminômetro TD 20/20 (Turner Designs Instrument). A lise das células TT foi feita 72h após a transfeção e a das células HEK293 48h após, devido à diferença do tempo de replicação de cada uma destas células. O tempo de duplicação da célula TT é 83h e o da HEK 293 é entre 20 e 24h (ATCC).

V.16- ENSAIOS COM LINFÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS

1. Separação de células mononucleares do sangue

Para cada experimento, foram coletados 30 mL de sangue de doador saudável em tubo com EDTA que foi posteriormente diluído em 30 mL de PBS. Em tubos de 50 mL foram colocados 12 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) e, em seguida, foram adicionados 20 mL de sangue diluído, evitando-se a mistura com o Ficoll-Paque. Os tubos foram centrifugados a 900 g por 30 min a 18°C, sem freio. Após a centrifugação, a nuvem de células mononucleares foi retirada com pipeta Pasteur e colocada em tubo de 50 mL, contendo 10 mL do tampão de Hanks. O volume do tubo foi completado para 20 mL e seguiu-se centrifugação a 600g por 10 min a 18°C, com freio. O sobrenadante foi desprezado e a amostra precipitada ressuspendida, depois, adicionou-se 10 mL de Hanks. Nesse momento todas as amostras de um mesmo doador foram ressuspendidas em 10mL de Hanks e colocadas em um tubo de 15 mL. Centrifugou-se a 300 g por 10 min a 18°C. Novamente desprezou-se o sobrenadante e

ao precipitado ressuspensionado em 10 mL de Hanks. Após nova centrifugação a 200 g por 10 minutos a 18°C as células foram ressuspensionadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (R-10 Invitrogen). A partir desse ponto as células estavam prontas para serem usadas nos diferentes experimentos.

2. Diferenciação de células dendríticas

Na diferenciação de células dendríticas (DCs) as PBMCs (células mononucleares de sangue periférico) foram ressuspensionadas para concentração de 5×10^6 /mL, plaqueando-se 1mL em cada poço das placas de cultura de 12 poços. As células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 2 horas para aderência das células. Posteriormente as células não-aderentes foram retiradas e acrescentou-se 1mL de meio R-10 suplementado com 50ng/mL do fator estimulante GM-CSF e 50ng/mL de IL-4. Após 4 dias de incubação, a cultura foi suplementada com a mesma concentração de citocina colocada no primeiro dia de cultura, e no sexto dia as células foram ativadas com 50ng/mL de TNF- α . A cultura foi mantida em estufa de CO₂ a 37°C por 7 dias para completa diferenciação e ativação das DCs.

3. Ensaio de proliferação linfocitária

3.1. Marcação de PBMC

As células foram contadas e centrifugadas a 290g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as 10^7 células ressuspensionadas em 1 mL de PBS-BSA 0,1% e adicionou-se 1 μ L de CFSE (corante *CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester*) 5mM. As células foram incubadas no escuro por 15 minutos com agitação. Posteriormente foram adicionados 10 mL de meio R-10 e as células centrifugadas a 290 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi dispensado e repetiu-se o último passo de lavagem. As células foram contadas antes da última centrifugação e ressuspensionadas de maneira a ter concentração de 1×10^5 células/100 μ L.

3.2. Co-cultura

Foram colocadas 1×10^5 células por poço em placa de 96 poços fundo em U. À cultura de células foram adicionadas porcentagens decrescentes do sobrenadante (50%, 10%, 1%, 0,25% e 0,01%) das células em estudo contendo IL-12 e 1 μ g de fitohemaglutinina A (PHA, Sigma). Como controles foi mantido um poço com PBMC sem estímulo e um poço ao qual foi adicionado o mitógeno PHA. As placas foram mantidas por 5 dias em estufa de CO₂ a 37°C e o sobrenadante foi recolhido, as células ressuspensionadas em PBS-BSA 0,5% e usadas para leitura de proliferação no

FACS Calibur (BD), utilizando-se 20000 células por reação. Para análise dos resultados foi utilizado o software Winmd, analisando-se os linfócitos separados em *gate* por tamanho e granulosidade.

3.3. Cálculo do índice de proliferação

Através do software de análise Winmd foi obtida a fluorescência média (*Gmean*) de cada amostra e do controle de linfócitos T que não receberam nenhum estímulo para proliferação, a partir do qual era possível fazer o cálculo dos índices de proliferação. Índice de proliferação =
$$\frac{\text{Gmean linfócito controle}}{\text{Gmean experimental}}$$

4. Citometria de fluxo

Após a diferenciação, as DCs foram marcadas com anticorpos para verificação da diferenciação e ativação das mesmas. As células foram colocadas em microtubos numa concentração de $2,5 \times 10^5$ células para marcação com os anticorpos. Os microtubos foram centrifugados a 18000 g por 10 seg a 4°C e o sobrenadante foi dispensado. Foi adicionado 200µL de PBS-BSA 0,5% e seguiu-se nova centrifugação. O último passo foi repetido mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 30µL de PBS-BSA 0,5%. Foram adicionados 3µL dos anticorpos específicos descritos na tabela 5. Após a adição dos anticorpos, as amostras foram incubadas por 20 minutos a 4°C no escuro. Ao término da incubação foram adicionados à amostra 200µL de PBS-BSA 0,5% e seguiu-se centrifugação a 18000g por 10 seg a 4°C. O sobrenadante foi dispensado e a lavagem repetida por duas vezes. Finalmente o sobrenadante foi dispensado e as amostras ressuspensas em 200µL de PBS-BSA 0,5%. A seguir as amostras foram submetidas à leitura no citômetro de Fluxo FACSCalibur (BD), utilizando-se 15000 células por reação. Para análise dos resultados foi utilizado o software Winmd.

Tabela 5. Anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo das DCs.

Especificidade	Clone	Origem	Marcação	Fabricante
HLA-DR	G46-6 (L243)	IgG2a, κ de camundongo	FITC	BD
CD14	M5E2	IgG2a, κ de camundongo	FITC	BD
CD80	L307.4	IgG1, κ de camundongo	FITC	BD
CD86	2331(fun-1)	IgG1, κ de camundongo	FITC	BD
CD83	HB15e	IgG1, κ de camundongo	PE	BD
CD11c	B-ly6	IgG1, κ de camundongo	PE	BD
CD40	5C3	IgG1, κ de camundongo	PE	BD

5. ELISA para citocinas

Os sobrenadantes recolhidos nas proliferações foram usados para dosagem das citocinas IFN-γ e IL-4 por ELISA utilizando os kits OptEIA para citocinas (BD

Biosciences) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços fundo chato foram cobertas com 50 µL/poço de anticorpo de captura diluídos 1:250 em tampão de captura. As placas foram seladas e incubadas por 18 horas a 4°C. Foram lavadas três vezes, na lavadora automática de ELISA, com 300 µL/poço de tampão de lavagem, ao final retirava-se o excesso de tampão de lavagem batendo a placa contra uma superfície coberta com papel absorvente. As placas foram bloqueadas com 200µL/poço de tampão de bloqueio e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Após incubação as placas foram lavadas com 300 µL/poço do tampão de lavagem, retirando-se excesso de tampão no final. Foram colocados 45 µL/poço das amostras e das diluições utilizadas para fazer a curva padrão das citocinas em duplicata, a placa foi selada e incubada a temperatura ambiente por 2 horas. Após essa nova incubação as placas foram lavadas cinco vezes com 300 µL/poço, retirando-se excesso do tampão de lavagem no final. Foi adicionado 50 µL/poço do anticorpo de detecção diluído 1:250 e de SAV-HRP (*Streptavidin-Horseradish Peroxidase*) diluídos em tampão de bloqueio, a placa foi incubada por 1 hora no escuro a temperatura ambiente. Seguiu-se uma lavagem de sete vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem, retirando-se bem o excesso de tampão no final. Adicionou-se 50 µL/poço da solução de substrato e incubou-se por 30 min no escuro a temperatura ambiente. Foram adicionados 50 µL/poço da solução de parada e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. Para análise dos resultados foi utilizado o software SOFT max Pro.

V.17- AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

A avaliação da apoptose da célula TT foi feita através da quantificação da fragmentação do DNA, empregando o estojo comercial Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche), conforme orientações do fabricante. Os fragmentos de DNA associados a histonas são patognomônicos de apoptose. A leitura da absorbância foi feita no equipamento *Anthos3*. As células TT (10⁵ células) foram semeadas em placa de poço de 35mm, e a transfecção, em duplicata, foi feita quando as células estavam com confluência de 80%. Vinte e quatro horas após a transfecção, 100µM de ganciclovir foi adicionado. No quinto dia após a transfecção, as células em cultura foram tripsinizadas e após contagem em câmara de Neubauer, o ensaio de Elisa foi feito com 10⁵ células. Como controle positivo de apoptose 10⁵ células TT foram tratadas com camptothecina 0,1 mg/mL (inibidora da Topoisomerase I) (Sigma) por 4 horas.

VI. RESULTADOS

VI.1- CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDIO TERAPÊUTICO pTCPtkevl12

Neste estudo foi construído o plasmídeo terapêutico pTCPtkevl12 contendo os genes timidina quinase (HSV-tk) e interleucina 12 otimizada (evIL-12), sob o controle do promotor da calcitonina modificado, conforme mostrado em Materiais e Métodos (V.13).

Confirmou-se a construção do plasmídeo por análise com enzimas de restrição e seqüenciamento. A especificidade da expressão e eficácia dos genes terapêuticos deste vetor foram avaliados através de estudos funcionais em cultura de células.

VI.2- ESPECIFICIDADE DO PROMOTOR

Para confirmar que o promotor da calcitonina modificado (TCP) era específico de células parafoliculares, foi avaliada a expressão do gene da luciferase *firefly* (Luc) sob controle dos promotores TCP (plasmídeo pTCPLuc) e do SV40 (plasmídeo pGL3 control) nas células HEK 293 (de rim embrionário humano) e TT (de carcinoma medular humano). Também foi avaliada a expressão do gene da luciferase *firefly*, presente no plasmídeo pGL3 basic que não possui promotor eucarionte. Em todos os casos foram feitos três experimentos independentes, em duplicata (Tabela 6).

Tabela 6. Expressão do gene Luc nas células HEK 293 e TT

	Célula hospedeira			
	HEK 293		TT	
Plasmídeo	100ng	1000ng	1000ng	2000ng
pGL3basic	22,68	2057	0,057	-
PGL3 control	4449 ± 239	>9999	0,059±0,015	0,071±0,011
pTCPLuc	185,9 ± 9,4	>9999	0,320±0,003	0,827±0,056

Como era esperado, nas células TT houve expressão do gene da luciferase tanto sob controle do promotor SV40, quanto do TCP, observando-se valores de atividade da luciferase maiores com o promotor TCP.

Contudo, na célula HEK 293 o promotor TCP também foi funcional, embora com eficiência menor que a do promotor SV40, quando empregados

100 ng de plasmídio na transfecção. Quando a eficiência de transfecção era aumentada, foram observados valores de expressão do gene Luc extremamente elevados com ambos promotores.

Em todos os experimentos, a leitura da atividade da luciferase das células não transfectadas (controle negativo), sempre mostrou valores inferiores a 0,010.

Sendo assim, a especificidade do promotor TCP foi comprovada em transfecções com até 100-200ng de pTCPLuc, por poço de 35mm contendo 2×10^5 células HEK 293. Nestas condições, a expressão do gene da luciferase controlado pelo promotor TCP é aproximadamente 4% da observada com o promotor SV-40. O promotor TCP, especialmente quando em quantidades plasmidiais superiores a 1000ng, não se mostrou específico para células TT (CMT). Este promotor também foi ativo em células COS-1 (linhagem celular fibroblasto-like de rim de macaco africano) em transfecções com 1000ng de pTCPLuc e altas eficiências de transfecção.

VI.3- AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA IL-12 OTIMIZADA ATRAVÉS DE PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA E ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células TT foram co-transfectadas com pGL3 basic (10ng) e pTCPtkeVIL-12, pTCPmIL-12 ou pTCPtk. A normalização da eficiência de transfecção foi dada pela leitura da atividade da luciferase do pGL3 basic após 72h de incubação em todos os experimentos.

Foi feita coleta do sobrenadante após 24, 48 e 72 horas após a transfecção para avaliação de proliferação linfocitária e estimulação de células dendríticas pela interleucina 12 (IL-12) secretada no sobrenadante. Os experimentos foram feitos em duplicata e alguns em triplicata.

Para verificar se haveria sinergismo entre os genes terapêuticos evIL-12 (interleucina 12 otimizada/evolved) e tk (timidina quinase; que fosforila o ganciclovir (GCV), induzindo apoptose), foi avaliada a proliferação linfocitária com o estímulo do sobrenadante da cultura das células TT transfectadas com pTCPtkeVIL-12, após 5 dias da adição do GCV (6 dias após a transfecção) .

Os resultados de avaliação funcional das interleucinas estão apresentados separadamente porque em cada um dos experimentos realizados empregou-se PBMCs (células mononucleares de sangue periférico) de diferentes doadores e cada doador pode ter grau diferente de pré ativação das células.

- **Proliferação Linfocitária:**

Interleucina 12 murina (mIL-12) e otimizada/evolved (evIL-12) mostraram-se capazes de induzir proliferação linfocitária. O índice de proliferação (IP) linfocitária, após 5 dias de cultura de linfócitos, foi baixo quando estes linfócitos foram estimulados com o sobrenadante de células TT ou HEK 293 não transfectadas (IP= 1,69 ou 1,64, respectivamente). Linfócitos estimulados apenas com fitohemaglutinina (PHA) 1 μ g (potente mitógeno) tiveram IP de 4,58. Linfócitos estimulados com PHA 1 μ g e sobrenadante contendo mIL-12 ou evIL-12, mostraram um IP três vezes maior que o IP alcançado apenas com o estímulo de PHA, tanto com sobrenadante das células TT quanto das células HEK 293 transfectadas (Tabela 7A, Figura 45).

Tabela 7A. Proliferação Linfocitária empregando 50% do sobrenadante das culturas das células HEK 293 e TT (EXPERIMENTO 1).

	Atividade de luciferase (10ng de pGL3 basic)	Índice Proliferação Linfocitária , com 100 μ L de sobrenadante
Linfócitos com PHA 1 μ g	----	4,58
Células TT		
TT com pTCPtkevil-12 sem PHA	0,008	2,27
TT com pTCPtkevil-12 + PHA 1 μ g	0,008	13,56
TT com pTCPmIL-12 sem PHA	0,012	1,75
TT com pTCPmIL-12 + PHA 1 μ g	0,012	14,14
TT não transfectada, sem PHA (controle negativo)	0,007	1,69
Células HEK 293		
HEK com pTCPtkevil-12 sem PHA	6,280	1,44
HEK com pTCPtkevil-12 + PHA 1 μ g	6,280	11,98
HEK com pTCPmIL-12 sem PHA	13,45	1,43
HEK com pTCPmIL-12 + PHA 1 μ g	13,45	10,98
HEK não transfectada sem PHA (controle negativo)	0,010	1,64

Figura 45. Imagem da proliferação linfocitária medida em citometria de fluxo.

Os ensaios de proliferação linfocitária que empregaram 50% de sobrenadante (100μL) e 0,25% (0,5μL) apresentaram IPs semelhantes sob estímulo da mIL-12 ou da evIL-12 (Tabelas 7A e 7B).

Tabela 7B. Proliferação Linfocitária empregando 25% do sobrenadante das culturas das células TT pré-estimuladas com 1μg PHA (EXPERIMENTO 2).

Plasmídio transfectado em células TT	Atividade luciferase 10ng pGL3 basic	Índice Proliferação Linfocitária		
		Tempo da coleta após transfecção		
		24h	48h	72h
pTCPtkeVIL-12	0,022	4,99 ± 0,45	3,11 ± 0,42	1,72 ± 0,97
pTCPmIL-12	0,021	3,89 ± 0,87	4,13 ± 0,49	1,73 ± 0,93

*Experimento feito em duplicata

- **Avaliação da produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos estimulados com mL-12 e evIL-12**

A interleucina 12 estimula diferenciação de linfócitos T para um padrão Th1(caracterizado por altos valores de IFN- γ e baixos valores de IL-4) tanto diretamente através da diferenciação das células CD4 ativadas em células efectoras Th1 quanto indiretamente através da indução de secreção de IFN- γ . A geração de células CD4+ “helper” de perfil Th1 ajuda na geração de células CD8+ citotóxicas.

Para verificar o estímulo da via Th1 pelas interleucinas 12 foi quantificada, por ELISA, a produção de IFN- γ e de IL-4 pelos linfócitos estimulados com os sobrenadantes contendo IL-12 murina ou IL-12 otimizada/evolved, na presença ou não de fitohemaglutinina (PHA).

Nos experimentos, diferentes volumes dos sobrenadantes foram utilizados, desde 0,02 μ L (0,01%) dos 2mL coletados de poço de cultura de células até 100 μ L (50%).

Na presença de PHA, tanto os sobrenadantes contendo IL-12 murina quanto IL-12 otimizada/evolved induziram os linfócitos a produzir quantidade extremamente elevada de IFN- γ , acima do limite de detecção da curva (300pg/mL), mesmo quando o sobrenadante da cultura linfocitária estimulada foi diluída 3x. Nestas condições os valores de IL-4 foram extremamente baixos, inferiores ao limite inferior da curva (Tabela 8A).

Tabela 8A. Produção das citocinas IFN- γ e IL-4, medida por ELISA, em 0,5 μ L de sobrenadante da proliferação linfocitária (0,25%), com 1 μ g PHA
Limite de detecção da curva de IFN- γ entre 300 e 4,5 pg/mL e de IL-4 entre 500 e 7,8 pg/mL.

Plasmídeo transfectado em células TT	Tempo de coleta					
	24h		48h		72h	
EXPERIMENTO 2A	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
pTCPtkeVIL-12	7767 (>lim.sup.)	5,78 (<lim.inf.)	7008 (>lim.sup.)	5,04 (<lim.inf.)	----	----
pTCPmIL-12	7035 (>lim.sup.)	5,12 (<lim.inf.)	7089 (>lim.sup.)	5,21 (<lim.inf.)	----	----
EXPERIMENTO 2B						
pTCPtkeVIL-12	7998 (>lim.sup.)	5,42 (<lim.inf.)	6615 (>lim.sup.)	3,95 (<lim.inf.)	11769 (>lim.sup.)	5,15 (<lim.inf.)
pTCPmIL-12	7707 (>lim.sup.)	3,74 (<lim.inf.)	7329 (>lim.sup.)	11,98 (<lim.inf.)	9678 (>lim.sup.)	6,21 (<lim.inf.)

Quando os linfócitos foram estimulados apenas com o correspondente sobrenadante (100µL), sem fitohemaglutinina (PHA), foi possível verificar que a IL-12 otimizada/evolved estimulou mais os linfócitos em cultura a produzir IFN- γ que a IL-12 murina. Os sobrenadantes das células TT transfectadas com pTCPtkeviL-12 induziram os linfócitos a produzir 428,6 pg/mL de IFN- γ , enquanto que com os da transfecção com pTCPmIL-12 produziu-se 26,8 pg/mL de IFN- γ . Resultados similares foram obtidos com sobrenadantes das células HEK 293 (tabela 8B).

Tabela 8B. Produção de IFN- γ , medido por ELISA, em 100µL sobrenadante da proliferação linfocitária (50%), com e sem PHA. Limite de detecção da curva de IFN- γ entre 300 e 4,5 pg/mL.

EXPERIMENTO 1	Células TT – IFN- γ (pg/mL)	Células HEK - IFN- γ (pg/mL)
Sem transfecção, sem PHA (controle negativo)	69,5	7,9
pTCPtkeviL-12 sem PHA	428,6	84,3
pTCPtkeviL-12 + PHA 1µg	4307,2 (>lim.sup.)	4361,5 (>lim.sup.)
pTCPmIL-12 sem PHA	26,8	12,7
pTCPmIL-12 + PHA 1µg	4650,0 (>lim.sup.)	4374,0 (>lim.sup.)

Quando os linfócitos em cultura foram estimulados com baixíssima quantidade de sobrenadante (0,02µL) e PHA 1µg, não se observou diferença significativa entre os valores de IFN- γ produzidos com estímulo da mIL-12 (239,28 pg/mL $\pm$ 8,82) em relação aos controles negativos (211,89 pg/mL; 206,78 pg/mL). Nestas mesmas condições, a produção de IFN- γ pelos linfócitos em cultura estimulados com evIL-12 de sobrenadante colhido 24h e 48h após a transfecção foi superior a 700 pg/mL. Mesmo após 6 dias da transfecção e após tratamento com ganciclovir por 5 dias, os valores de IFN- γ produzidos foram elevados (473,84 pg/mL $\pm$ 83,89) (tabela 8C). Através destes resultados ficou evidente a superioridade da evIL-12 sobre a mIL-12 na indução de produção de IFN- γ pelos linfócitos em cultura.

Em todos os experimentos de cultura de linfócitos com sobrenadante contendo IL-12 otimizada/evolved ou murina, com ou sem adição de PHA, os valores de IL-4, uma citocina característica de resposta imunológica Th2, foram extremamente baixos, inferiores ao valor mínimo de detecção da curva (valores mostrados apenas na Tabela 8A).

Tabela 8C. Concentração de IFN- γ , medido por ELISA, no sobrenadante da proliferação linfocitária com 1 μ g PHA, estimulados com 0,02 μ L (0,01%) dos sobrenadantes das culturas de células TT transfectadas com os diferentes plasmídios.

Limite de detecção da curva de IFN- γ entre 300 e 4,5 pg/mL.

EXPERIMENTO 3	IFN-γ (pg/mL)
Células TT transfectadas com:	
pTCPmIL-12 sobrenadante de 48h	239,28 $\pm$ 8,82
pTCPtkeVIL-12 sobrenadante de 48h	724,33
pTCPtkeVIL-12 sobrenadante de 24h	719,54 $\pm$ 44,32
pTCPtkeVIL-12 sobrenadante de 5 $^{\circ}$. dia após GCV	473,84 $\pm$ 83,89
pTCP sobrenadante 24h (controle negativo)	389,02
Meio HAM F12K puro (controle negativo)	211,89
Células TT não transfectadas(controle negativo)	206,78

• **Avaliação dos linfócitos CD4 e CD8**

Um aumento na relação dos linfócitos CD4/CD8 favorece a ação anti-tumoral. Para avaliar se a interleucina 12 possuía também este papel, foi feito experimento de proliferação de linfócitos, sem PHA, utilizando como estímulo célula dendrítica (DC) diferenciada com o fator estimulante GM-CSF e IL-4 acrescido ou não de sobrenadante das culturas de células TT.

No primeiro experimento (Experimento 1) foi observado que as interleucinas 12, murina e otimizada/evolved, presentes nos sobrenadantes das culturas de células transfectadas com os respectivos plasmídios, produziram células dendríticas com aumento da razão CD4/CD8 (Tabela 9A).

Tabela 9A. Proliferação de linfócitos (sem PHA) com DC diferenciada

EXPERIMENTO 1 com sobrenadante (10%) de células TT	CD4 (%)	CD8 (%)	Razão CD4/CD8
DC diferenciada (valor basal)	50,49	30,17	1,67
Células TT transfectadas com:			
pTCPtkeVIL-12	68,75	22,79	2,96
PTCPmIL-12	66,71	23,62	2,75

Figura 46. Imagem da leitura dos linfócitos marcados em citometria de fluxo

No experimento 4 (Tabela 9B) a razão CD4/CD8 dos linfócitos proliferados empregando-se DCs estimuladas apenas por GM-CSF e IL-4 é 1,74, ao passo que DCs estimuladas por GM-CSF e IL-4 e sobrenadante de células TT não transfectadas proliferam linfócitos numa razão CD4/CD8 de 2,16. Não há mais incremento na razão CD4/CD8 ao se empregar DCs que foram estimuladas por mIL-12 ou evIL-12. Portanto, não são as interleucinas 12 as responsáveis por DCs capazes de aumentar a razão CD4/CD8 de linfócitos, mas sim fatores secretados pelas células TT em cultura.

Tabela 9B. Proliferação de linfócitos (sem PHA) com DC diferenciada

EXPERIMENTO 4 com sobrenadante (10%) de células TT			
	CD4 (%)	CD8 (%)	Razão CD4/CD8
Células TT transfectadas com:			
pTCP sbte 24h (controle negativo)	59,53	29,38	2,02
pTCPmIL-12 sbte 48h	60,13 ± 1,87	29,17 ± 1,65	2,07 ± 0,18
pTCPtkeviL-12 sbte 48h	59,94 ± 1,59	30,70 ± 0,87	1,89 ± 0,11
pTCPtkeviL-12 sbte 24h	59,93 ± 1,18	29,23 ± 0,98	2,05 ± 0,11
pTCPtkeviL-12 sbte 5º. dia após GCV	58,35 ± 4,50	29,17 ± 1,91	2,01 ± 0,28
DC diferenciada (valor basal)	54,07	31,10	1,74
Meio HAM F12K puro (Contr. negativo)	56,34	30,11	1,87
Células TT não transfectadas (Contr. neg.)	60,47	28,05	2,16

- **Maturação das Células Dendríticas**

DCs ativadas expressam moléculas de adesão como ICAM-1 (CD54), CD58, CD11c, CD172, CD49d e CD 49c; expressam moléculas co-estimulatórias e acessórias tais como B7.1/CD80, B7.2/CD86, CD40 e CD83; e expressam também receptores de quimiocinas como CCR7 e CXCR4.

Foram dosadas as moléculas CD14 (marcador de monócitos e macrófagos), CD11c e HLA-DR (marcadores de DCs), CD80 (marcador de

estimulação de DCs), CD86 (co-estimulador constitutivo de DCs), CD83 (co-estimulador induzido de DCs) e CD40 (estimulador de DCs).

Analisando o perfil fenotípico das DCs cultivadas com IL-12 murina ou otimizada/evolved durante a diferenciação, verificou-se que em ambos os casos a porcentagem de células positivas para os marcadores CD80, CD83 e CD86 não se alterou na presença da IL-12. A notória diferença foi o grau de expressão da molécula CD40 nestas células, notadamente maior nas DCs que foram tratadas com a IL-12 otimizada/evolved (36,91%) que com a mL12 (14,76%) (Tabela 10A, Figura 47).

Tabela 10A. Imunofenótipo das células dendríticas com sobrenadante (10%) de células TT (EXPERIMENTO 1).

	DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS						
	CD14	CD11c	HLA-DR	CD83	CD86	CD80	CD40
DC estimulada GM-CSF e IL-4	47,00	98,38	99,44	76,59	98,66	86,79	4,14
pTCPtkevIL-12	71,00	92,22	98,31	56,96	95,37	74,64	36,91
pTCPmIL-12	66,06	94,09	98,43	83,81	97,65	81,69	14,76

Figura 47. Imagem da leitura das DCs diferenciadas, sem e com IL-12, mostrando a expressão das moléculas de membrana CD14 e CD40, em citometria de fluxo.

Nas DCs tratadas com o sobrenadante de células TT transfectadas com o plasmídio pTCPtkevIL-12 antes de se adicionar ganciclovir verificou-se uma expressão de CD40 menor que nas DCs tratadas com o sobrenadante das mesmas células TT após 5 dias de tratamento com o ganciclovir (10,11% e 27,96% respectivamente) (Tabela 10B).

Tabela 10B. Imunofenótipo das células dendríticas **com sobrenadante (10%) de células TT (EXPERIMENTO 3).**

	DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS						
	CD14	CD11c	HLA-DR	CD83	CD86	CD80	CD40
DC estimulada GM-CSF e IL-4	0,54	97,11	90,33	71,70	96,20	23,93	0,86
pTCP sbte 24h (controle negativo)	0,39	86,44	67,75	24,82	89,54	10,99	9,73
pTCPmIL-12 sbte 48h	1,06 ± 0,18	85,18 ± 0,64	81,58 ± 5,13	29,26 ± 5,53	90,42 ± 3,20	17,24 ± 2,18	17,26 ± 4,83
pTCPtkeVIL-12 sbte 48h	1,67 ± 1,13	71,76 ± 6,48	70,49 ± 16,31	21,45 ± 4,88	92,13 ± 1,82	12,24 ± 2,39	19,11 ± 1,56
pTCPtkeVIL-12 sbte 24h	1,05	79,85	63,80	33,43	86,87	5,97	10,11
pTCPtkeVIL-12 sbte 5ºdia pós GCV	8,09 ± 2,14	74,56 ± 2,33	84,34 ± 0,78	14,13 ± 1,41	87,09 ± 6,02	16,41 ± 1,80	27,96 ± 0,47

Figura 48. Imagem da leitura das DCs diferenciadas, sem e com IL-12, mostrando a expressão das moléculas de membrana CD14 e CD40, em citometria de fluxo.

O resultado da leitura por citometria de fluxo das células dendríticas diferenciadas informa a percentagem de células dendríticas que apresentam em suas membranas moléculas CDs, tais como CD40, CD80, etc. Por sua vez,

a imunofluorescência (MFI) das células dendríticas diferenciadas informa a quantidade de moléculas CDs presentes por membrana.

Os resultados da MFI para CD40 nas DCs, no experimento 3, mostraram um maior número de moléculas de CD40 por membrana de DC quando empregou-se como estímulo sobrenadantes de 48h de culturas de células TT transfectadas com pTCPtkeVIL-12 que nas com pTCPmIL12 (M1: 62,22 e 57,23 respectivamente). O M1 nas DCs estimuladas com sobrenadantes de células TT transfectadas com pTCPtkeVIL-12 após a adição de GCV foi maior que o M1 alcançado utilizando-se o sobrenadante 24h após transfecção sem a adição de GCV (68,50 e 58,85 respectivamente) (Figura 49).

Figura 49. Imunofluorescência (MFI) para CD40.

VI.4- AVALIAÇÃO DA APOPTOSE, INDUZIDA PELO SISTEMA SUICIDA HSV-TK/GANCICLOVIR

Os resultados do ELISA obtidos, de dois experimentos independentes, confirmaram que o plasmídio terapêutico pTCPevIL-12 promoveu a apoptose das células TT induzida pelo sistema timidina

quinase/ganciclovir. Verificou-se também, que o grau de apoptose das células TT transfectadas com o plasmídio pTCPtkeVL-12 ou pTCPtk foi similar.

Tabela 11. Apoptose células TT tratadas com 100µM de ganciclovir – Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

	Absorbância
Branco (kit)	0,078 ± 0,045
Controle positivo (kit)	3,891 ± 0,118
pTCPtk	1,411 ± 0,018
pTCPevIL-12	1,201 ± 0,153
TT sem transfecção, sem GCV	0,792 ± 0,015
TT sem transfecção, com GCV	0,888
Camptothecina	0,773 ± 0,072

VII. DISCUSSÃO

Atualmente, a cirurgia é a melhor opção terapêutica para o Carcinoma Medular de Tireóide (CMT). Entretanto, em muitos casos, ela não é curativa (Evans et al, 1999; Orlandi et al, 2001). Em decorrência deste significativo grupo de pacientes com prognóstico reservado se justifica a busca por novas terapias para o CMT. Estudos em terapia gênica vêm sendo realizados na tentativa de se estabelecer uma nova alternativa terapêutica.

Este trabalho propôs a construção de um plasmídio contendo o gene “suicida” timidina quinase do vírus Herpes simplex (HSV-tk) e o gene imunomodulador da interleucina 12 otimizada/evolved (evIL12), ambos controlados pelo promotor modificado da calcitonina (TCP). O objetivo maior do trabalho foi obter uma molécula terapêutica capaz de promover a morte das células de CMT e de estimular o sistema imune visando terapia gênica do Carcinoma Medular de Tireóide.

Foi necessário construir o plasmídio pTCPtkeVL-12 contendo três cassetes de expressão: 1. TCP – gene da timidina quinase tipo 1 (HSV-tk) – PA; 2. TCP – subunidade 35 do gene da interleucina 12 otimizada (ev 35) – PA; 3. TCP - subunidade 40 do gene da interleucina 12 otimizada (ev 40) – PA (Figura 50).

Figura 50. O plasmídeo pTCPtkevlL-12.

A escolha do gene HSV-tk foi baseada em sua ampla utilização, até o momento, com bons resultados e, principalmente, por ele ser um “gene suicida” que permite alcançar o objetivo do tratamento que é a apoptose das células cancerosas pela ativação do ganciclovir (GCV), mesmo que a expressão gênica ocorra por um curto período de tempo (Marconi et al, 2000). É importante salientar que um dos fatores limitantes da terapia gênica nos dias de hoje é a expressão transitória e não permanente dos genes terapêuticos. Outra vantagem do sistema suicida HSV-tk/GCV é a destruição de células pelo *efeito bystander*, que é a passagem do GCV fosforilado, ativado, para as células vizinhas à célula transfectada através das junções intercelulares das membranas das células. Numerosos estudos afirmam que o sistema HSV-tk/GCV tem alta eficácia de matar células tumorais, mesmo quando há baixa eficiência de transfecção (Marconi et al, 2000). Outra característica peculiar e bastante interessante da timidina quinase é que ela torna o tumor radio-sensível (Nishihara et al, 1997).

Dentre as mais promissoras estratégias de terapia gênica aplicadas ao câncer figura o sistema suicida timidina quinase/ ganciclovir, associado ao emprego de citocinas, uma associação sabidamente sinérgica (DeGroot et al, 2001). Além das interleucinas em conjunto com HSV-tk/GCV estimularem o sistema imunológico contra as células tumorais, elas ainda conferem memória imunológica contra recidivas (DeGroot et al, 2001). De fato, analisando os resultados dos trabalhos de terapia gênica para CMT, os melhores resultados surgiram quando houve associação de dois métodos anti-tumorais sinérgicos: sistema suicida HSV-tk/GCV e ativação da resposta imunológica (Soler et al, 1996; Lausson et al, 1996; Zhang & DeGroot, 2001).

O presente estudo é o primeiro a utilizar a IL-12 otimizada para tratamento do CMT. Até o momento, a única interleucina 12 empregada no tratamento de células tumorais medulares humanas foi a murina (Zhang & DeGroot, 2000b; Yamasaki et al, 2002). Levando-se em consideração que a interleucina otimizada confere uma resposta imune bastante superior em comparação à IL-12 humana (Leong et al, 2003), o emprego desta interleucina neste novo vetor traz a esperança de resultados ainda mais positivos que os publicados com a interleucina 12 murina (Zhang & DeGroot, 2000b; Yamasaki et al, 2002).

A construção do vetor proposto pTCPtkevlL-12 foi confirmada por análise enzimática de restrição e seqüenciamento; e a ação dos genes terapêuticos da timidina quinase (HSV-tk) e da interleucina 12 otimizada (evIL-12) foi avaliada através de estudos funcionais. A atividade biológica da timidina quinase foi analisada através do grau de apoptose induzido por ela nas células de carcinoma medular transfectadas. Também, a evIL-12 secretada no sobrenadante foi avaliada quanto à sua capacidade de induzir proliferação linfocitária, promover diferenciação de linfócitos T para um padrão Th1 e maturar células dendríticas.

Vários trabalhos de terapia gênica em carcinoma medular de tireóide, *in vitro* e *in vivo*, mostraram a eficácia do promotor da calcitonina modificado TSE2.CP1 (TCP) de Messina et al, 2002. Para avaliar a atividade do promotor TCP presente no plasmídio pTCPtkevlL-12, foi construído o plasmídio pTCPLuc, contendo o gene da luciferase *firefly*, sob controle deste promotor. Foi comparado o grau de expressão do gene da luciferase sob o comando do promotor TCP e do promotor SV-40 em três experimentos independentes, os quais tiveram resultados muito semelhantes. Embora, não tenha sido possível normalizar os valores de expressão com a eficiência de transfecção, os resultados obtidos sugerem que o promotor TCP expressou o gene da luciferase, aproximadamente 10 vezes mais que o promotor SV-40 nas células TT (Tabela 6). Vale lembrar que o SV-40 é considerado pela literatura um promotor bastante forte (Gorman et al, 1982).

A alta atividade do promotor nas células TT também foi confirmada em estudo funcional para avaliação da ação da evIL-12 (Resultados VI.3). As

células TT transfectadas com pTCPtkevlL-12 secretaram nos sobrenadantes, colhidos 24, 48 e 72h após transfecção, quantidade suficiente da proteína evIL-12 para induzir proliferação linfocitária (Tabela 7A) e promover diferenciação para resposta Th1 (Tabela 8B). Estes resultados foram observados mesmos quando empregadas pequenas alíquotas de sobrenadantes, de 0,02 μ L até 100 μ L. Assim sendo, o promotor da calcitonina modificado (TCP) se mostrou extremamente forte nas células TT.

A especificidade do promotor TCP foi avaliada através do grau de expressão do gene da luciferase em células HEK 293 (de rim embrionário humano). Em três experimentos independentes de transfecção com até 100-200ng de pTCPLuc, foi confirmada a especificidade do promotor. Nestas condições, a expressão do gene da luciferase controlado pelo promotor TCP foi aproximadamente 4% da observada com o promotor SV-40 (Tabela 6).

No entanto, o promotor TCP, quando em quantidades plasmidiais superiores a 1000ng, também apresentou considerável atividade em outros tipos celulares, tanto em células HEK 293 (Tabela 6) como em células COS-1 (linhagem celular fibroblasto-like de rim de macaco africano). Similarmente ao que foi visto transfectando células TT com o plasmídio pTCPtkevlL-12, os sobrenadantes colhidos 24, 48 e 72h após a transfecção das células HEK293, apresentaram quantidade suficiente da proteína IL-12 otimizada para induzir proliferação linfocitária e promover diferenciação para resposta Th1, mesmo quando se empregou apenas 0,02 μ L deste sobrenadante nos experimentos (Tabelas 7A e 8B). Na literatura, diferentes autores mostraram que vetores que utilizam o promotor TCP são muito eficazes para tratamento *in vitro* e *in vivo* (ratos) de carcinoma medular de tireóide (Tabela 3A: Drosten et al, 2002 e 2003, Messina et al, 2003 e Cengic et al, 2005; Tabela 3B: Yamasaki et al, 2002; Tabela 3C: Yamasaki et al, 2004). Yamasaki et al (2002) demonstrou forte atividade do promotor TCP nas células TT: 145,4% em relação ao promotor forte do citomegalovírus (CMV). Em relação à especificidade do promotor, vários trabalhos demonstraram que o promotor TCP não é específico em todas as situações já estudadas, em concordância com os resultados obtidos pelo presente estudo. Minemura et al (2000) e Messina et al (2003) afirmaram que a expressão do promotor TCP varia conforme a quantidade de

vetor transfectado. Messina et al (2000) que desenvolveram o promotor TCP, afirmaram que a remoção de seqüências de nucleotídios do promotor natural CT/CGRP aumentou a expressão tecido-específica, em células TT; porém, também contribuiu para a expressão do promotor TCP nas células HEK 293. Também relataram que nas células TCP-1 (carcinoma papilífero humano), HeLa (carcinoma de colo uterino), HepG2 (hepatoma) e T47-D (carcinoma de mama) a expressão do TCP foi baixa. Yamasaki et al (2002) demonstraram fraca atividade do promotor TCP em células COS-1, HepG2 e T98G (glioblastoma); e considerável atividade nas células C6 (células neuronais produtoras de CGRP: 28,3% de atividade em relação ao promotor forte do citomegalovírus).

Minemura et al (2000) mostraram que TCP apresentou fraca, mas detectável atividade nas células COS-1; a conclusão deste autor foi que o promotor TCP conferiu uma expressão parcialmente seletiva do gene repórter (luciferase) em adenovírus. Neste mesmo trabalho também foi concluído que o efeito de morte celular induzido pelo “sistema suicida” HSV-tk/GCV dependeu tanto das concentrações de GCV empregadas quanto dos títulos virais aplicados; observou apoptose de 20 a 30% das células HeLa e 75% de apoptose nas rMTC (células de carcinoma medular de rato), tratadas em igual tempo com a mesma quantidade de GCV e mesmos títulos do adenovírus AdTCPtk. Resultados semelhantes aos de Minemura et al (2000), foram observados por Messina et al (2003) ao tratar células TT e HepG2 ou HeLa com o “sistema suicida” PNP/fludarabina. Nos estudos *in vivo* foi relatada baixa toxicidade com emprego de vetores contendo o promotor TCP, não houve aumento das transaminases hepáticas e nem no volume esplênico (Yamasaki et al, 2002).

Foi avaliada a capacidade do sistema suicida HSV-tk/ganciclovir de induzir morte das células de carcinoma medular humano (células TT). Para isto, foi feita a transfecção do plasmídio pTCPtkvIL-12 nas células TT, posteriormente tratadas com GCV, confirmando-se grande efeito citotóxico do sistema, como mostra a Tabela 11. A apoptose das células TT foi avaliada através da quantificação de fragmentos de DNA associados a histonas (patognomônicos de apoptose) por ELISA. O grau de apoptose das células TT,

transfectadas com o plasmídio pTCPTkevlL-12 ou pTCPTk (contendo apenas o gene da timidina quinase sob controle do promotor TCP), tratadas com 100 μ M de GCV, foi semelhante (Tabela 11), ou seja, não foi observado sinergismo entre os genes da timidina quinase e da IL-12. Este resultado foi concordante com os da literatura, que relatam sinergismo na associação do sistema HSV-tk/GCV e citocinas (IL-12 ou IL-2) somente em estudos *in vivo* e não *in vitro* (DeGroot et al, 2001).

A IL-12 otimizada/evolved (evIL-12) foi desenvolvida por Punnonen e colaboradores (Leong et al, 2003) que mostraram que esta interleucina 12 induz proliferação 128 vezes maior de linfócitos T humanos e incrementa em 10 vezes a atividade específica de diferenciação para Th1, em comparação com a IL-12 humana. Para avaliar a capacidade imunoestimuladora da evIL-12 presente no plasmídio pTCPTkevlL-12 os sobrenadantes das culturas de células transfectadas com este plasmídio foram utilizados para estimular linfócitos e células dendríticas. Foi estudada também a capacidade imunoestimulatória da IL-12 murina, a única IL-12 usada nos trabalhos de terapia gênica para carcinoma medular de tireóide até o momento, conforme já dito anteriormente.

Nos experimentos feitos para avaliar proliferação linfocitária, foi verificado que ambas as IL-12 promoveram intensa proliferação linfocitária, com índices de proliferação (IP) muito elevados (Tabelas 7A e 7B); porém não houve diferença de resposta entre mL-12 ou evIL-12. A principal função da interleucina 12, todavia, não é estimular proliferação linfocitária, mas sim induzir fortemente diferenciação para Th1, fundamental para uma eficiente resposta anti-tumoral (Trinchieri G, 1997). A habilidade de ambas IL-12 induzir resposta Th1, caracterizada por altas quantidades de IFN- γ e baixas quantidades de IL-4 (característico de resposta Th2) (Robertson & Ritz, 1996) foi então estudada. Foi observado que ambas IL-12 proporcionaram forte resposta Th1 (Tabelas 8A, 8B e 8C). Desta vez, a evIL-12 mostrou-se superior à mL-12 na diferenciação para Th1; fato demonstrado através dos maiores níveis de IFN- γ produzidos pelos linfócitos em cultura estimulados com evIL-12 do que com mL-12 (Tabelas 8B e 8C).

Um dos mecanismos de escape à resposta imune apresentados pelas neoplasias é a geração de um ambiente onde as células dendríticas (DCs), as principais células apresentadoras de antígenos (APCs), não desempenham sua função de forma adequada. As alterações das DCs ocorrem em dois níveis. O primeiro é a deficiência de maturação: no microambiente tumoral, a passagem do estágio imaturo para o ativado está, muitas vezes, bloqueada devido à presença de altos níveis de IL-10. Num segundo nível, os monócitos (precursores de DCs), presentes na circulação sangüínea, apresentam deficiência em sua capacidade de diferenciação para células dendríticas (Barbuto JAM, 2005). É possível que, durante a progressão do tumor, a expressão de CD40 nas APCs ou de CD40-Ligante nas células T esteja reduzida, permitindo o crescimento tumoral (Murugaiyan G et al, 2007).

No presente trabalho foi analisada a capacidade da IL-12 estimular/maturar células dendríticas através do estudo das proteínas de membrana características das DC maturadas (CD80, CD83, CD86, CD40), que definem o imunofenótipo dessas células. Os resultados de citometria de fluxo e imunofluorescência mostraram aumento da expressão de CD40, indicando que as interleucinas-12 (mIL-12 e evIL-12) são capazes melhorar a ativação das DCs. Não foi observada alteração da expressão das outras proteínas marcadoras de maturação (CD80, CD83, CD86). Por outro lado, a evIL-12 aumentou mais a porcentagem de células dendríticas expressando CD40 em suas membranas (células CD40+) que a mIL-12 (36,91% e 14,74 % de células dendríticas CD40+, respectivamente – Tabela 10A). Verificou-se também que o sobrenadante das células TT transfectadas com o plasmídio pTCPtkevIL-12 tratadas com 100 μ M de ganciclovir (que estimula o sistema suicida HSV-tk/GCV) tornou-se mais eficiente em expressar CD40 nas células dendríticas que antes da adição do ganciclovir (10,11% e 27,96% de células dendríticas CD40+, respectivamente – Tabela 10B). Estes últimos valores de expressão de CD40 após estímulo com evIL-12 foram menores que os obtidos no primeiro experimento (36,91%) pois as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) eram de outro doador, com diferente grau de pré-ativação celular.

Também foi observado por imunofluorescência que a quantidade de moléculas CD40 nas DCs foi discretamente mais elevada nas estimuladas com

evIL-12 que com mIL-12 (M1: 62,22 e 57,23 respectivamente). Também foi observado que o sobrenadante das células TT transfectadas com o plasmídeo pTCPtkeVIL-12 tratadas com 100 μ M de ganciclovir aumentou a quantidade de CD40 nas DCs (M1 pré-GCV: 58,85. M1 pós-GCV: 68,50) (Figura 49).

O incremento de expressão de CD40 nas DCs após tratamento com GCV poderia explicar, ao menos em parte, o sinergismo observado com a expressão simultânea dos genes de timidina quinase e IL-12 murina, alcançando melhores respostas em termos de redução tumoral, *in vivo*, em CMT de ratos (Tabela 3C).

Já foi comprovada a capacidade da interleucina 12 em restaurar a função de células dendríticas e, conseqüentemente, aumentar a resposta imune celular anti-tumoral (Williams NJ et al, 1998). O resultado deste estudo mostrando aumento de expressão de CD40 induzido pela IL-12, em especial pela evIL-12, poderia ser justificado pela presença de receptores de IL-12 (IL-12R) nas membranas das DCs (Grohmann U et al, 1998). Bianchi e colaboradores (1999) mostraram que a interação IL-12/IL-12R aumenta a expressão de moléculas MHC II maduras e melhora a função apresentadora de antígenos das DCs; e que possivelmente, a IL-12 medie, contribua ou interfira na modulação da atividade das DCs, envolvendo CD40.

Imunoterapia com células dendríticas induzem forte resposta imune acompanhada de regressão do tumor primário e das metástases (Bhardwaj N et al, 1996). Há trabalhos com células dendríticas em CMT; Bachleitner-Hofmann et al (2002 e 2006) estudaram maturação das DCs com lisados tumorais e Schott et al (2001) já empregaram imunoterapia com células dendríticas em humanos, e em alguns dos pacientes tratados obtiveram queda dos níveis de calcitonina e CEA séricos, além de redução do tumor ou de suas metástases. Uma série de estratégias para gerar células dendríticas (DC) vem sendo investigada e há uma crescente necessidade em determinar quais seriam as mais promissoras candidatas à terapia em estudos clínicos para tratamento de câncer (Fontes AM et al, 2006). As perspectivas terapêuticas para uso do plasmídeo pTCPtkeVIL-12 em imunoterapia, induzindo maturação de células dendríticas são bastante animadoras. Vários trabalhos afirmam que há uma relação direta entre maior expressão de CD40 nas células dendríticas e

maior regressão tumoral (French et al, 1999; Diehl et al, 1999; Sotomayor et al, 1999). Altos níveis de expressão CD40 proporcionam resposta anti-tumoral mais eficaz, através de maior resposta dos linfócitos T citotóxicos (CTL) e maior produção de IFN- γ (Murugaiyan G et al, 2007). O estímulo via CD40 induz a migração das DCs para os tecidos linfóides, onde haverá conveniente ativação dos linfócitos (*priming*) e melhor resposta anti-tumoral a metástases (Fujita N et al, 2003). A vacina com células dendríticas estimuladas com evIL-12, contendo altas concentrações de CD40, pode ser uma grande esperança para o tratamento das metástases, muitas vezes ocultas, de pacientes com CMT.

A perspectiva futura para o plasmídeo pTCPtkevlL-12, é primeiramente avaliar a sua eficiência em ratos WAG/Rij portadores de carcinoma medular de tireóide. Este plasmídeo poderia ser inoculado nos tumores por eletroporação (Li et al, 2002) ou através de um vetor viral (Barzon et al, 2005). Se no modelo animal, houver boa redução tumoral e memória contra recidivas, abre-se a possibilidade de estudo clínico em pacientes portadores de carcinoma medular.

Resultados ainda mais promissores podem ser esperados através de tratamento com vacinoterapia empregando células dendríticas pulsadas com antígenos tumorais e estimuladas com evIL-12 (*in vitro*), simultaneamente à introdução do plasmídeo pTCPtkevlL-12 no tumor. A presença de evIL-12 e ganciclovir fosforilado pela timidina quinase, no microambiente tumoral, além de induzir morte tumoral imediata, poderia promover a ativação das células dendríticas, *in vivo*, com alta expressão de CD40. Seriam várias forças agindo sinergicamente para promover a destruição de células tumorais e restabelecimento de resposta imune anti-tumoral eficaz.

VIII. CONCLUSÕES

- Foi construído o plasmídeo terapêutico pTCPtkevlL-12, contendo três cassetes de expressão (TCP-tk-PA, TCP-ev35-PA e TCP-ev40-PA) capaz de promover morte das células de carcinoma medular de tireóide (CMT) e de estimular o sistema imune, visando terapia gênica cito-redutora e imunomoduladora do CMT. O plasmídeo poderia ser utilizado através de aplicação intra-tumoral e estimulação de células dendríticas.
- Vacinoterapia com células dendríticas estimuladas com sobrenadante de células TT transfectadas com pTCPtkevlL-12 e tratadas com ganciclovir, devido a elevada expressão de CD40, é esperança de um tratamento mais eficaz das metástases do CMT.
- O promotor da calcitonina (TCP) mostrou-se extremamente potente nas células de CMT. No entanto, não se mostrou específico em todas as situações avaliadas.
- Foi demonstrada a superioridade da IL-12 otimizada/evolved (evIL-12) em relação à murina, a única utilizada até hoje em terapia gênica de CMT.

IX. APÊNDICE

IX.1. Plasmídios

Figura 6. Plasmídeo pBStk

Figura 7. Plasmídeo pTCPmIL-12

Figura 8. Plasmídios pGL3 basic e pGL3 control (Promega)

Figura 9. Plasmídio pcDNAev35

Figura 10. Plasmídio pcDNAev40

Figura 11. Plasmído pCR2.TOPO

Figura 12. Plasmídio pTCP

Figura 13. Plasmídio pTCPtk

Figura 14. Plasmídio pTCPev35

Figura 15. Plasmídio TOPOev40

Figura 16. Plasmídio pTCPev40

Figura 17. Plasmídio pTCPtkev40

Figura 18. O plasmídio final – pTCPtkevIL-12

Figura 19. Plasmídio pTCPLuc

IX.2. Meios de Cultura

1- Meio SOC

Triptona 2,0%,
Extrato de levedura 0,5%,
NaCl 10 mM,
KCl 2,5 mM,
MgCl₂ 10 mM,
MgSO₄ 10 mM,
Glicose 20 mM.

2- Meio LB (Meio completo):

NaCl 1%,
Triptona 1%,
Extrato de levedura 0,5%.

3- Meio LB-AP:

Meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina (AP).

4- Meio LB ágar-AP XGAL/IPTG

Meio LB ágar-AP contendo 2,0 µl/ml de uma solução de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) 2%, e 0,5 µl/ml de uma solução 0,1 M de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside).

IX.3. Soluções

1- Solução I:

Tris-HCl 25 mM,
EDTA 10 mM,
Glicose 50 mM,
pH 8,0.

2- Solução II:

NaOH 0,2 N,
SDS 1% .

3- Solução III:

Acetato de sódio 3 M,
Ácido acético 2 M,
pH 4,8.

4- TE 1X:

Tris-HCl 10 mM,
EDTA 1 mM,
pH 8,0.

5- TAE 1X

Tris 40mM,
Ácido acético 20mM,
EDTA 1 mM.

6- Solução de RNase A:

10 mg/ml de RNase A dissolvida em água e fervida em banho-maria por 10 minutos.

7- "Stop mix" ("marcador de corrida de gel"):

Azul de bromofenol 0,5%,

EDTA 100mM pH 8,0,

Glicerol 50%.

IX.4. Primers

Primers utilizados no seqüenciamento dos plasmídios pTCPtkevil-12 e pTCPLuc

Nome primer	Seqüência dos primers (5'→ 3')
Pdelta	Forward TTTGGGCGTAACCGAGTAAG Reverse GGAGCCCATCACATTCTGAC
TK	Forward CCCATGCACGTCTTTATCCT Reverse AGTAGCGTGGGCATTTTCTG
Ev35	Forward CCACAAAATCCTCCCTTGA Reverse GAGTTTGTCTGGCCTTCTGC
Ev40	Forward TGACATTCTGCATCCAGGTC Reverse TGTCACACGTGAGGACCACT

ANEXOS

X. ANEXOS

Construção do plasmídio TCP (Anexo 1)

Construção do plasmídio TCPtk (Anexo 2)

Construção do plasmídio TCPEv35 (Anexo 3)

Construção do plasmídio TOPOev40 (Anexo 4)

Construção do plasmídio TCPEv40 (Anexo 5)

Construção do plasmídio TCPtkev40 (Anexo 6)

Construção do plasmídio TCPTkevIL-12 (Anexo 7)

Construção do plasmídio TCPLuc (Anexo 8)

XI. BIBLIOGRAFIA

Abdelmoumene N, Schlumberger M, Gardet P, Roche A, Travagli JP, Francese P, Parmentier C. 1994 Selective venous sampling catheterisation for localisation of persisting medullary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 69: 1141-1144.

Abdul-Ghani R, Ohana P, Matouk I, Ayesh S, Ayesh B, Laster M, Bibi O, Giladi H, Molnar-Kimber K, Sughyer MA, de Groot N, Hochberg A. 2000 Use of transcriptional regulatory sequences of telomerase (hTER and hTERT) for selective killing of cancer cells. *Mol Ther* 2:539-544.

Ali M, Lemoine NR, Ring CJA. 1994 The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Therapy* 1: 367-384.

Arruda VR, Fields PA, Milner R, Wanwright L, De Miguel MP, Donovan PJ, Herzog RW, Nichols TC, Biegel JA, Razavi M, Dake M, Huff D, Flake AW, Couto L, Kay MA, High KA 2001 Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther* 4:586-592

Bachleitner-Hofmann T, Stift A, Friedl J, Pfragner R, Radelbauer K, Dubsky P, Schüller G, Benkö T, Niederle B, Brostjan C, Jakesz R, Gnant M. 2002 Stimulation of Autologous Antitumor T-Cell Responses Against Medullary Thyroid Carcinoma using Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87(3): 1098-1104.

Bachleitner-Hofmann T, Strohschneider M, Krieger P, Sachet M, Dubsky P, Hayden H, Schoppmann SF, Pfragner R, Gnant M, Friedl J, Stift A. 2006 Heat Shock Treatment of Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells Enhances Their capacity to Elicit Antitumor T Cell Responses against Medullary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91(11): 4571-4577.

Barbet J, Campion L, Kraeber-Bodéré, Chatal JF. 2005 Prognostic Impact of Serum Calcitonin and Carcinoembryonic Antigen Doubling-Times in Patients with Medullary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 90(11): 6077-6084.

Barbuto JAM. 2005 Vacina terapêutica contra o Câncer: Pesquisadores brasileiros utilizam células dendríticas e cancerígenas para tratar tumores. *Scientific American Brasil* 38.

Barzon L, Bonaguro R, Palù G, Boscaro M 2000 New perspectives for gene therapy in endocrinology. *Eur J Endocrinol* 143:447-466

Barzon L, Boscaro M, Palu G. 2004 Endocrine Aspects of Cancer Gene Therapy. *Endocr Rev* 25(1):1-44.

Barzon L, Pacenti M, Tacaliti A, Franchin E, Bruglia M, Boscaro M and Palù G. 2005 A Pilot Study of Combined Suicide/Cytokine Gene Therapy in Two Patients with End-Stage Anaplastic Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 90(5): 2831-2834.

Bauerschmitz GJ, Lam JT, Kanerva A, Suzuki K, Nettelbeck DM, Dmitriev I, Krasnyk V, Mikheeva GV, Barnes MN, Alvarez RD, Dall P, Alemany R, Curiel DT, Hemminki A. 2002 Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res* 62:1266-1270

Beltinger C, Fulda S, Kammertones T, Meyer E, Uckert W, Debatin KM. 1999 Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 8699-8704.

Berlingieri MT, Manfioleti G, Santoro M, Bandiera A, Visconti R, Giancotti V, Fusco A. 1995 Inhibition of HMGI-C protein synthesis supresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells. *Mol Cell Biol* 15(3): 1545-1553.

Bhardwaj N, Seder RA, Reddy A, Feldman MV. 1996 IL-12 in Conjunction with Dendritic Cells Enhances Antiviral CD8+ CTL Responses In Vitro. *J. Clin. Invest.* 98: 715-722.

Bianchi R, Grohmann U, Vacca C, Belladonna ML, Fioretti MC, Puccetti P. 1999 Autocrine IL-12 Is Involved in Dendritic Cell Modulation Via CD40 Ligation. *The Journal of Immunology* 163: 2517-2521.

Blanchard KT, Boekelheide K 1997 Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis in vivo. *Biol Reprod* 56:495-500.

Bockmann M, Hilken G, Schmidt A, Cranston AN, Tannapfel A, Drosten M, Frilling A, Ponder BA, Putzer BM. 2005 *Hum Gene Ther* 16(11): 1267-1275.

Bonomino, MH. 2004 Um estudo para o desenvolvimento de novas estratégias utilizando a terapia celular e gênica, visando a eliminação de células residuais da Leucemia Linfóide Aguda pré B pediátrica. Tese (doutorado) - UFRJ/ Instituto de Ciências Biomédicas/Programa de Pós-graduação em Química Biológica.

Braiden V, Nagayama Y, Iitaka M, Namba H, Nima M, Yamashita S. 1998 Retrovirus-mediated suicide gene/prodrug therapy targeting carcinoma using a thyroid-specific promoter. *Endocrinology*. 139: 3996-3999.

Bramson JL, Hitt M, Galdie J, Graham FL. 1997 Pre-existing immunity to adenovirus does not prevent tumor regression following intratumoral administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination. *Gene Ther*. 4: 1069-1076.

Bromberg JF et al. 1996 Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 7673-7678.

Camargo RYA, Tomimori EK. 1998 Diagnóstico dos nódulos tireoideanos baseado na avaliação ultra-sonográfica e citologia combinada. *Arq Bras Endocrinol Metab* 42:273-6.

Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncone G, Wilhelm SM, Santoro M. 2006 BAY 43-9006 Inhibition of Oncogenic RET Mutants. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2006 98(5):326-334.

Castle BE et al. 1993 Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J Immunol*. 151: 1777-1788

Cengic N, Baker CH, Schülz M, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. 2005 A Novel Therapeutic Strategy for Medullary Thyroid Cancer Based on radiodine Therapy Following Tissue-Specific Sodium iodide Symporter Gene Expression. *J Clin Endocrinol Metab* 90(8):4457-64.

Cerutti J, Trapasso F, Battaglia C, Zhang L, Martelli ML, Visconti R et al. 1996 Block of c-myc expression by antisense oligonucleotides inhibits proliferation of human thyroid carcinoma cell lines. *ClinCancer Research* 2: 119-126.

Chatal JF, Campion L, Kraeber-Bodéré F, Bardet S, Vuillez JP, Charbonnel B, Rohmer V, Chang CH, Sharkey RM, Goldenberg DM, Barbet J. 2006 Survival Improvement in Patients with Medullary Thyroid Carcinoma Who Undergo Pretargeted Anti-Carcinoembryonic-Antigen Radioimmunotherapy: A Collaborative Study With the French Endocrine Group. *J Clin Oncol* 24(11): 1705-1711.

Chen S-H, Kosai K-i, Xu B, Pham-Nguyen K, Contant C, Finegold MJ, Woo SLC. 1996 Combination suicide and cytokine gene therapy for metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res* 56: 1737-1741.

Chiodoni C et al. 1999 Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naïve mice for a cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med*. 190: 125-133.

Chun YS, Saji M, Zeiger MA. 1998 Overexpression of TTF-1 and PAX-8 restores thyroglobulin gene promoter activity in ARO and WRO cell lines. *Surgery*. 124: 1100-1105.

Clark WHJR et al. 1989 Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 81: 1893-1904.

Coeli CM, Brito SB, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro APAV, Vaisman M. 2005 Incidência e Mortalidade por Câncer de Tireóide no Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab* 49(4).

Cole KE et al. 1998 Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med*. 187: 2009-2021.

Cosma MP, Cardone M, Carlomagno F, Colantuoni V. 1998 Mutations in the extracellular domain cause RET loss of function by a dominant negative mechanism. *Mol Cell Biol* 18(6): 3321-3329.

- Culver KW et al. 1992 *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1553.
- Davies L, Welch HG. 2006 Increasing Incidence of Thyroid Cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 295:2164-2167.
- De Groot JWB, Links TP, Plukker JTM, Lips CJM, Hofstra RMW. 2006 *RET* as a Diagnostic and Therapeutic Target in Sporadic and Hereditary Endocrine Tumors. *Endocrine Reviews* 27(5): 535-560.
- DeGroot LJ, Zhang R. 2001 Gene Therapy for Thyroid Cancer: Where do We Stand? *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 2923-2928.
- DeGroot LJ and Zhang R. 2003 Gene Therapy of a Rat Follicular Thyroid Carcinoma Model with Adenoviral Vectors Transducing Murine Interleukin-12. *Endocrinology* 144(4): 1393-1398.
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. Pathology and genetics of tumours of the endocrine organs. Series: IARC/World Health Organization Classification Tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2004.
- Deonarain MP, Spooner RA, Epenetos AA. 1995 Genetic delivery of enzymes for cancer therapy. *Gene Therapy* 2: 235-244.
- Diefenbach A et al. 2001 Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*. 413: 165-171.
- Diehl L et al. 1999 CD40 activation *in vivo* overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat Med*. 5: 774-779.
- Dillen IJ van, Mulder NH, Vaalburg W, Vries EF de, and Hospers GA. 2002 Influence of the bystander effect on HSV-tk/GCV gene therapy. A review. *Curr Gene Ther* 2(3): 307-22.
- Dottorini ME, Assi A, Sironi M, Sangalli G, Spreafico C, Colombo L. 1996 Multivariate analysis of patients with medullary thyroid carcinoma. Prognostic significance and impact on treatment of clinical and pathologic variables. *Cancer* 77: 1556-1565.
- Drosten M, Frilling A, Stiewe T, Pützer BM. 2002 A new therapeutic approach in medullary thyroid cancer treatment: Inhibition of oncogenic RET signaling by adenoviral vector-mediated expression of a dominant-negative RET mutant. *Surgery* 132: 991-997.
- Drosten M and Pützer BM. 2003 Gene therapeutic approaches for medullary thyroid carcinoma treatment. *J Mol Med* 81(7): 411-419.
- Drosten M, Stiewe T, Pützer BM. 2003 Antitumor capacity of a dominant-negative RET proto-oncogene mutant in a medullary thyroid carcinoma model. *Human Gene Ther* 14: 971-982.
- Du ZX, Zhang HY, Gao da X, Wang HQ, LI YJ, Liu GL. 2006 Antisurvivin oligonucleotides inhibit growth and induce apoptosis in human medullary thyroid carcinoma cells. *Exp Mol Med* 38(3): 230-240.
- Dunn et al. 2002 Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3: 991-998
- Evans DB, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. 1999 The surgical treatment of medullary thyroid carcinoma. *Semin Surg Oncol* 16:50-63.
- Ezabella MCL, Hayashida CY, Abelin NMA, Toledo SPA. 1990a Calcitonina Como Marcador Tumoral do Carcinoma Medular da Tireóide. *Arq Bras Endocrinol Metab* 34 (1): 6-9.
- Ezabella MCL, Hayashida CY, Bisi H, Abelin NMA, Toledo SPA. 1990b Detecção Precoce do Carcinoma Medular de Tireóide. *Arq Bras Endocrinol Metab* 34 (3): 34-36.
- Fagin JA. 2004 How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *Journal of Endocrinology* 183: 249-256.
- Farre L, Rigau T, Mogas T, Garcia-Rocha M, Canal M, Gomez-Foix AM, Rodriguez-Gil JE 1999 Adenovirus-mediated introduction of DNA into pig sperm and offspring. *Mol Reprod Dev* 53:149-158

Feldman GL, Edmonds MW, Aisworth PJ, Schuffenecker I, Lenoir GM, Saxe AW. 2000 Variable expressivity of familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) due to a RETV804M (GTGAEATG) mutation. *Surgery* 128: 93-98.

Fersht N, Vini L, A'Hern R, Harmer C. 2001 The role of radiotherapy in the management of elevated calcitonin after surgery for medullary thyroid cancer. *Thyroid* 11: 1161-1168.

Fillat C, Carrio M, Cascante A, and Sangro B . 2003 Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther* 3(1): 13-26.

Fontes AM et al. 2006 Maturation of dendritic cells following exposure to different maturational stimuli. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 28(2): 89-96.

Frank O, Rudolph C, Heberlein C, von Neuhoff Nils, Schröck E, Schambach A, Schlegelberger B, Fehse B, Ostertag W, Stocking C and Baum C. 2004 Tumor cells escape suicide gene therapy by genetic and epigenetic instability. *Blood* 104(12): 3543-3549.

Frank-Raue K, Raue F, Burh H, Baldauf G, Lorenz D, Ziegler R. 1992 Localization of occult persisting medullary thyroid carcinoma before microsurgical reoperation. High sensitivity of selective venous catheterization. *Thyroid* 2: 113.

French RR et al. 1999 CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med.* 5: 548-553.

Fromigué J, Baere TD, Baudin E, Dromain C, Leboulleux S, Schlumberger M. 2006 Review: Chemoembolization for Liver Metastases from Medullary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91(7): 2496-2499.

Fujita N, Kagamu H, Yoshizawa H, Itoh K, Kuriyama H, Matsumoto N, Ishiguro T, Tanaka J, Suzuki E, Hamada H, Gejyo F. 2001 CD40 ligand promotes priming of fully potent antitumor CD4+ T cells in draining lymph nodes in the presence of apoptotic tumor cells. *J. Immunol.* 167: 5678.

Galanis E, Vile R, Russell S. 2001 Delivery systems intended for in vivo gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors. *Crit Rev Oncol Hematol* 38:177-192

Gharib H & Giuffrida D. 1998 Current diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Annals of Oncology* 9: 695-701.

Gimm O. 2001 Thyroid Cancer. *Cancer Lett* 163: 143-156.

Gordon JW 2001 Direct exposure of mouse ovaries and oocytes to high doses of an adenovirus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Mol Ther* 3:557-564

Grohmann U, Belladonna ML, Bianchi R, Orabona C, Ayroldi E, Fioretti MC, Puccetti P. 1998 IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF- κ B and primes DC for IL-12 production. *Immunity* 9: 315.

Hall SJ, Bar-Chama N, Ta S, Gordon JW 2000 Direct exposure of mouse spermatogenic cells to high doses of adenovirus gene therapy vector does not result in germ cell transduction. *Hum Gene Ther* 11:1705-1712

Harrington KJ, Linardakis E, Vile RG. 2000 Transcriptional control: an essential component of cancer gene therapy strategies? *Adv Drug Del Rev* 44:167-184.

Harris JD, Gutierrez AA, Hurst HC, Sikora K, Lemoine NR. 1994 Gene therapy for cancer using tumor-specific prodrug activation. *Gene Ther* 1:170-175

Harshyne LA et al. 2001 Dendritic cells acquire antigens from live cells for crosspresentation to CTL *J Immunol.*166: 3717-3723.

Harvey BG, Hackett NR, El-Sawy T, Rosengart TK, Hirschowitz EA, Lieberman MD, Lesser ML, Crystal RG. 1999 Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. *J Virol* 73:6729-6742

Hauache OM, Vieira JGH, Maciel RMB. 2003 Diagnóstico Laboratorial do Carcinoma Medular de Tireóide: Calcitonina Basal e Testes de Estímulo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47(5): 529-533.

- Haviv YS, Curiel DT. 2001 Conditional gene targeting for cancer gene therapy. *Adv Drug Del Rev* 53:135–154.
- Hiltunen MO, Turunen MP, Turunen AM, Rissanen TT, Laitinen M, Kosma VM, Yla-Herttuala S. 2000 Biodistribution of adenoviral vector to nontarget tissues after local in vivo gene transfer to arterial wall using intravascular and periadventitial gene delivery methods. *FASEB J* 14:2230–2236.
- Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, Shah JP, Fremgen AM, Stewart AK, Holzer S. 2000 Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the United States during 1996. *Cancer* 89:202–217.
- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. 1998 A national cancer data base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer*. 83(12): 2638-2648.
- Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002 The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*. 13: 95-109.
- Imanishi R, Ohtsuru A, Iwamatsu M, Iioka T, Namba H, Seto S, Yano K, Yamashita S. 2002 A histone deacetylase inhibitor enhances killing of undifferentiated thyroid carcinoma cells by p53 gene therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4821-4824.
- Kakinuma H, Bergert ER, Spitzweg C, Cheville JC, Lieber MM and Morris JC. 2003 Probasin Promoter (ARR₂PB)-Driven, Prostate-Specific Expression of the Human Sodium Iodide Symporter (*h-NIS*) for Targeted Radioiodine Therapy of Prostate Cancer. *Cancer Research* 63: 7840-7844.
- Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB. 2004 The Diagnosis and Medical Management of Advanced Neuroendocrine Tumors. *Endocrine Reviews* 25(3): 458-511.
- Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. 2000 Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 88(5): 1139-1148.
- Kebebew et al. 2005 Extent of disease and practice patterns for medullary thyroid cancer. *J Am Coll Surg* 200(6): 890-896.
- Khanna R et al. 1997 Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand upregulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol*. 159: 5782-5785.
- Kitazono M, Chuman Y, Aikou T, Fojo T. 2001 Construction of Gene Therapy Vectors Targeting Thyroid Cells: Enhancement of Activity and Specificity with Histone Deacetylase Inhibitors and agents Modulating the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Pathway and Demonstration of Activity in Follicular and Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:834-840.
- Kochanek S. 1999 High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 10:2451–2459.
- Kraeber-Bodéré F, Maurel-Sai C, Campion L, Faivre-Chauvet A, Mirallié E, Chérel M, Supiot S, Barbet J, Chatal JF, Thérez P. 2002 Enhanced Antitumor Activity of Combined Radioimmunotherapy and Paclitaxel in Medullary Thyroid Cancer Xenograft. *Mol Cancer Ther* 1: 267-274.
- Kraeber-Bodéré F, Rousseau C, Bodet-Milin C, Ferrer L, Faivre-Chauvet A, Campion L, Vuillez JP, Devillers A, Chang CH, Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J. 2006 Targeting, Toxicity, and Efficacy of 2-Step, Pretargeted Radioimmunotherapy Using a Chimeric Bispecific Antibody and ¹³¹I-Labeled Bivalent Hapten in a Phase I Optimization Clinical Trial. *Journal of Nuclear Medicine* 47 (2): 247-255.
- Kumagai T, Tanio Y, Osaki T, Hosoe S, Tachibana I, Ueno K, Kijima T, Horai T, Kishimoto T. 1996 Eradication of Myc-overexpressing small cell lung cancer cells transfected with herpes simplex virus thymidine kinase gene containing Myc-Max response elements. *Cancer Res* 56:354–358.
- Kumar A et al. 1997 Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science*. 278:1630-1632.
- Labriolle-Vaylet C, Cattani P, Sarfati E, Wioland M, Billotey C, Brochériou C, Rouvier E, Roquancourt A, Rostène W, Askienazy S, Barbet J, Milhaud G, Gruaz-Guyon A. 2000 Successful Surgical Removal of Occult Metastases of Medullary Thyroid Carcinoma Recurrences with the Help of Immunoscintigraphy and Radioimmunoguided Surgery. *Clinical Cancer Research* 6: 363-371.

Lausson S, Fournes B, Borrel C, Milhaud G, Treilhou-Lahille F. 1996 Immune response against medullary thyroid carcinoma (MTC) induced by parenteral and/or interleukin-2-secreting MTC cells in a rat model of human familial medullary thyroid carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 43: 116-123.

Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Ryan JL. 1997 Effects of Single-Dose Interleukin-12 Exposure on Interleukin-12-Associated Toxicity and Interferon- γ Production. *Blood* 90: 2541-2548.

Leong SR, Chang JCC, Ong R, Dawes G, Stemmer WPC, Punnonen J. 2003 Optimized expression and specific activity of IL-12 by directed molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(3): 1163-1168.

Li S, Zhang X, Xia X. 2002 Regression of Tumor Growth and Induction of Long-Term Antitumor Memory by Interleukin 12 Electro-Gene Therapy. *J Natl Cancer Inst* 94 (10): 762-768.

Liu K et al. 2002 Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med*. 196: 1091-1097.

Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, Van Vroonhoven TJ, Roehrer HD. 2003 European Multiple Endocrine Neoplasia (EUROMEN) Study Group. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 16: 1517-1525.

Magalhães PKR, Castro M, Elias LLK, Maciel LMZ. 2003 Carcinoma medular de tireóide: da definição às bases moleculares. *Arq Bras Endocrinol Metab* 47(5)

Marconi P et al. 2000 Connexin 43-enhanced suicide gene therapy using herpesviral vectors. *Mol. Ther.* 1: 71-81.

Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. 1995 Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management update. *Thyroid* 5: 407-424.

Martins RG. 2006 Medullary Thyroid Cancer: Options for Systemic Therapy of Metastatic Disease? *Journal of Clinical Oncology* 24(11): 1653-1655.

Messina M, Yu DMT, Learoyd DL, Both GW, Molloy PL, Robinson BG. 2000 High level, tissue-specific expression of a modified calcitonin/calcitonin gene-related peptide promoter in a human medullary thyroid carcinoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 164: 219-224.

Messina M, Yu DMT, Both GW, Molloy PL, Robinson BG. 2003 Calcitonin-Specific Transcription and Splicing Targets Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy to Medullary Thyroid Carcinoma Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88(3): 1310-1318.

Messina M & Robinson BG. 2007 Technology Insight: gene therapy and its potential role in the treatment of medullary thyroid carcinoma. *Nature*, vol 3, number 3 (www.nature.com/clinicalpractice/endmet).

Minemura K et al. 2000 Cell-specific induction of sensitivity to ganciclovir in thyroid carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase. *Endocrinology* 141: 1814-1822.

Moley J, Wells S, Dilley W, Tisell L. 1993 Reoperation for recurrent or persistent medullary thyroid cancer. *Surgery* 114: 1090-1095.

Moley JF, Dilley WG, DeBenedetti MK. 1997 Improved results of crevical reoperation for medullary thyroid carcinoma. *Ann Surg* 225: 734-740.

Moley JF. 2003 Medullary thyroid carcinoma. *Curr Tret Options Oncol* 4(4): 339-347.

Mougneau E, Hugues S, Glaichenhaus N. 2002 Antigen presentation by dendritic cells *in vivo*. *J Exp Med*.196: 1013-1016.

Murugaiyan G, Martin S, Saha B. 2007 Levels of CD40 expression on dendritic cells dictate tumour growth or regression. *Clin. Exp. Immunol.* 149: 194-202.

- Nabel EG, Gordon D, Yang ZY, Xu L, San H, Plautz GE, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ. 1992 Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther* 3:649–656.
- Nagayama Y, Nishihara E, Iitaka M, Yamashita S, Niwa M. 1999 Enhanced efficacy of transcriptionally targeted suicide gene/prodrug for thyroid carcinoma with the Cre-loxP system. *Cancer Res.* 59: 3049-3052.
- Nagayama Y, Yokoi H, Takeda K, Hasegawa M, Nishihara E, Namba H, Yamashita S, Niwa M. 2000 Adenovirus-mediated tumor suppressor p53 gene therapy for anaplastic thyroid carcinoma in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4081-4086.
- Nagayama Y, Nishihara E, Namba H, Yokoi H, Hasegawa M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Hamada H, Yamashita S, Niwa M. 2001 Targeting the replication of adenovirus to p53-defective thyroid carcinoma with a p53-regulated Cre/loxP system. *Cancer Gene Ther* 8: 36-44.
- Narimatsu M, Nagayama Y, Akino K, Yasuda M, Yamamoto T, Yang TT, Ohtsuru A, Namba H, Yamashita S, Ayabe H, Niwa M. 1998 Therapeutic usefulness of wild-type p53 gene introduction in a p53-null anaplastic thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3668-3672.
- Niranjan A, Moriushi S, Glorioso JC et al. 2000 Effective Treatment of Experimental Glioblastoma by HSV Vector-Mediated TNF- α and HSV-tk Gene Transfer in Combination with Radiosurgery and Ganciclovir Administration. *Molecular Therapy*. 2: 114-120.
- Nishihara E, Nagayama Y, Mawatari F, Tanaka K, Namba H, Niwa M, Yamashita S. 1997 Retrovirus-Mediated Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Transduction Renders Human Thyroid Carcinoma Cell Lines Sensitive to Ganciclovir and Radiation *in Vitro* and *in Vivo*. *Endocrinol* 138(11): 4577-4583.
- Okada N, Iiyama S, Okada Y, Mizuguchi H, Hayakawa T, Fujita ST, Yamamoto A. 2005 Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cell expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12. *Cancer Gene Ther* 12: 72-83.
- O'Malley JrBW, Sewell DA, Li D, Kosai K-i, Chen S-h, Woo SLC, Duan L. 1997 The role of interleukin-2 in combination adenovirus gene therapy for head and neck cancer. *Mol Endocrinol* 11: 667-673.
- Orlandi F, Caraci P, Mussa A, Saggiorato E, Pancani G, Angeli A. 2001 Treatment of medullary thyroid carcinoma: na update. *Endocrine-Related Cancer* 8: 135-147.
- Paielli DL, Wing MS, Rogulski KR, Gilbert JD, Kolozsvary A, Kim JH, Hughes J, Schnell M, Thompson T, Freytag SO 2000 Evaluation of the biodistribution, persistence, toxicity, and potential of germ-line transmission of a replication-competent human adenovirus following intraprostatic administration in the mouse. *Mol Ther* 1:263–274
- Pardoll, DM. 2002 Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2: 227-238.
- Parks RJ. 2000 Improvements in adenoviral vector technology: overcoming barriers for gene therapy. *Clin Genet.* 58:1-11.
- Parthasarathy R et al. 1999 Hammerhead ribozyme-mediated inactivation of mutant *RET* in medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 59: 3911-3914.
- Peters AH, Drumm J, Ferrel C, Roth DA, Roth DM, McCaman M, Novak PL, Friedman J, Engler R, Braun RE 2001 Absence of germline infection in male mice following intraventricular injection of adenovirus. *Mol Ther* 4:603–613
- Portella G, Scala S, Vitagliano D, Vecchio G, Fusco A. 2002 ONYX-015, an E1B gene-defective adenovirus, induces cell death in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2525-2531.
- Portella G, Pacelli R, Libertini S, Cella L, Vecchio G, Salvatore M, Fusco A. 2003 ONYX-015 enhances radiation-induced death of human anaplastic thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5027-5032.

Presky D, Minetti L, Gillessen S, Wilkinson V, Wu C, Gubler U, Chizzonite R, Gately M. 1998 Analysis of the Multiple Interactions Between IL-12 and the High Affinity IL-12 Receptor Complex. *J. Immunol.* 160: 2174-2179.

Propato A et al. 2001 Apoptotic cells overexpress vinculin and induce vinculin-specific cytotoxic T-cell cross-priming. *Nat Med.* 7: 807-813.

Puñales MK, Graf H, Gross JL, Maia AL. 2003 RET codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2644-2649.

Puñales MK, Rocha AP, Gross JL, Maia AL. 2004 Carcinoma Medular de Tireóide: Aspectos Moleculares, Clínico-Oncológicos e Terapêuticos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 48 (1).

Putzer BM and Drosten M. 2004 The *RET* protooncogene: a potential target for molecular cancer therapy. *Trends Mol Med* 10: 351-357.

Quidville V, Segond N, Pidoux E, Cohen R, Jullienne A, Lausson S. 2004 Tumor Growth Inhibition by Indomethacin in a Mouse Model of Human Medullary Thyroid Cancer: Implication of Cyclooxygenases and 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase. *Endocrinology* 145(5): 2561-2571.

Randrianarison-Jewtawkoff V, Perricaudet M. 1995 Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals* 23: 145-157.

Raue F. 1998 German MTC/MEN Study Group. Medullary Thyroid Carcinoma/Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *Archives of Surgery* 383 334-336.

Robertson MJ and Ritz J. 1996 Interleukin 12: Basic Biology and Potential Applications in Cancer Treatment. *The Oncologist* 1(12): 88-97.

Russell WC. 2000 Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology.* 81: 2573-2604.

Salem ML, Gillanders WE, Kadima AN, El-Naggar S, Rubinstein MP, Demcheva M, Vournakis JN, Cole DJ. 2006 Review: novel nonviral delivery approaches for interleukin-12 protein and gene systems: curbing toxicity and enhancing adjuvant activity. *J Interferon Cytokine Res* 26(9): 593-608.

Santos JA, Bonatelli AP. 1999 Controle Genético dos Tumores do Sistema Nervoso Central. *Revista da Sociedade Brasileira de cancerologia* número 7.

Sato K et al. 1999 Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 162: 3865-3872.

Sato K, Yamashita N, Matsuyama T. 2002 Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell Immunol.* 215:186-194.

Scala S, Portella G, Fedele M, Chiapetta G, Fusco A. 2000 Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4256-4261.

Schmutzler C and Koehle J. 2000 Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *European Journal of Endocrinology* 143: 15-24.

Schott M, Seissler J, Lettmann M, Fouxon V, Scherbaum WA, Feldkamp J. 2001 Immunotherapy for Medullary Thyroid Carcinoma by Dendritic Cell vaccination. *J Clin Endocrinol Metab* 86(10): 4965-4969.

Scollo C, Baudin E, Travagli JP, Caillou B, Bellon N, Leboulleux S, Schlumberger M. 2003 Rationale for central and Bilateral Lymph Node Dissection in Sporadic and Hereditary Medullary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 88(5): 2070-2075.

Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. 1996 Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 87:3877-3882.

- Shankaran V. et al. 2001 IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 410: 1107-1111.
- Sharkey RM, Goldenberg DM. 2006 Targeted Therapy of Cancer: New Prospects for Antibodies and Immunoconjugates. *CA Cancer J Clin* 56: 226-243.
- Shimura H, Haraguchi K, Miyazaki A, Endo T, Onaya T. 1997 Iodide Uptake and Experimental ^{131}I Therapy in Transplanted Undifferentiated Thyroid Cancer Cells Expressing the Na^+/I^- Symporter Gene. *Endocrinol* 138(10): 4493-4496.
- Silva AMA, Maciel RMB, Silva MRD, Toledo SRC, Carvalho MB, Cerutti JM. 2003 A Novel Germ-Line Point Mutation in *RET* Exon 8 (Gly 533 Cys) in a Large Kindred with Familial Medullary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88(11): 5438-5443.
- Silva MCM, Figueira ELZ, Sá MFG. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2003 A metodologia de DNA shuffling na produção de diversidade gênica.
- Smailyte G, Miseikyte-Kaubriene E, Kurtinaitis J. 2006 Increasing thyroid cancer incidence in Lithuania in 1978-2003. *BMC Cancer* 6:284.
- Smit JWA, Schröder-van der Elst JP, Karperien M, Que I, van der Pluijm G, Goslings B, Romijn JA, van der Heide D. 2000 Reestablishment of In Vitro and In Vivo Iodide Uptake by Transfection of the Human Iodide Symporter (hNIS) in a hNIS defective Human Thyroid Carcinoma Cell Line. *Thyroid* 10(11): 939-943.
- Smit JWA, Schröder-van der Elst JP, Karperien M, Que I, Stokkel M, van der Heide D, Romijn JA. 2002 Iodide Kinetics and Experimental ^{131}I Therapy in a Xenotransplanted Human Sodium-Iodide Symporter-Transfected Human Follicular Thyroid Carcinoma Cell Line. *J Clin Endocrinol Metab* 87(3): 1247-1253.
- Smyth MJ, Taniguchi M, Street SEA. 2000 Anti-Tumor Activity of IL-12: Mechanisms of Innate Immunity That Are Model and Dose Dependent. *The Journal of Immunology* 165: 2665-2670.
- Soler MN, Milhaud G, Lekmine F, Treilhou-Lahille F. 1999 Treatment of medullary thyroid carcinoma (MTC) by combined expression of suicide and interleukin-2 genes. *Cancer Immunol Immunother*. 48: 91-99.
- Soler MN et al. 2000 Gene Therapy of rat medullary thyroid cancer by naked nitric oxide synthase II DNA injection. *J Gene Med* 2: 344-352.
- Sotomayor EM et al. 1999 Conversion of tumor-specific CD4 $^+$ T-cell tolerance to T-cell priming through *in vivo* ligation of CD40. *Nat Med*. 5: 780-787.
- Spitzweg C, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CYF and Morris JC. 2000 Treatment of Prostate Cancer by Radioiodine Therapy after Tissue-specific Expression of the Sodium Iodide Symporter. *Cancer Research* 60: 6526-6530.
- Spitzweg C, Harrington KJ, Pinke LA, Vile RG, Morris JC. 2001a The Sodium Iodide Symporter and Its potential Role in Cancer Therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 86(7): 3327-3335.
- Spitzweg C, Dietz AB, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CYF, Morris JC. 2001b In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. *Gene Ther* 8: 1524-1531.
- Spitzweg C. and Morris JC. 2004 Gene Therapy for Thyroid Cancer: Current Status and Future Prospects. *Thyroid* 14(6): 424-434.
- Springer CJ and Niculescu-Duvaz I. 2000 Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J Clin Invest* 105(9):1161-1167.
- Stamenkovic I, Clark EA, Seed B. 1989 A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J*. 8: 1403-1410.
- Strock CJ, Park J-I, Rosen DM, Ruggeri B, Denmeade SR, Ball DW, Nelkin BD. 2006 Activity of Irinotecan and the Tyrosine Kinase Inhibitor CEP-751 in Medullary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91(1): 79-84.

- Thierry AR, Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Rabinovich P, Gallo RC, Mahan LC 1995 Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9742–9746.
- Tissel LE, Dilley WG, Wells SA Jr. 1996 Progression of postoperative residual medullary thyroid carcinoma as monitored by plasma calcitonin levels. *Surgery* 119: 34-39.
- Tolcher AW et al. 2005 A phase II, pharmacokinetic, and biological correlative study of oblimersen sodium and docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11: 3854-3861.
- Toledo SPA, Santos MACG, Toledo RA, Lourenço Júnior DM. 2006 Impact of *RET* Proto-Oncogene Analysis on the Clinical Management of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *Clinics*: 61 (1) 59-70.
- Trinchieri G. 1995 Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 13: 251-276.
- Uribe M, Fenoglio-Prieser CM, Grimes M, Feind C. 1985 Medullary carcinoma of the thyroid gland. Clinical, pathological and immunohistochemical features with review of the literature. *Am J Surg Pathol* 9:577-94.
- Van Kooten C, Banchereau J. 2000 CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 67:2-17.
- Vassaux G, Martin-Duque P. 2004 Use of suicide genes for cancer gene therapy: study of different approaches. *Expert Opin Biol Ther* 4(4):519-30.
- Vitale G, Caraglia M, Ciccarelli A, Lupoli Gelsy, Abbruzzese A, Tagliaferri P, Lupoli Giovanni. 2001 Current Approaches and Perspectives in the Therapy of Medullary Thyroid Carcinoma. *Cancer* 91(9): 1797-1808.
- Watanabe S, Kagamu H, Yoshizawa H, Fujita N, Tanaka H, Tanaka J, Gejyo F. 2003 The Duration of Signaling through CD40 Directs Biological Ability of Dendritic Cells to Induce Antitumor Immunity. *J. Immunol*. 171: 5828-5836.
- Wigginton JM, Komschlies KL, Back TC, Franco JL, Brunda MJ, Wiltout RH. 1996 Administration of interleukin 12 with pulse interleukin 2 and the rapid and complete eradication of murine renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88: 38-43.
- Williams NJ, Harvey JJ, Duncan I, Booth RFG, Knight SC. 1998 Interleukin-12 Restores Dendritic Cell Function and Cell-Mediated Immunity in Retrovirus-Infected Mice. *Cel. Immunol*. 183(2): 121-130.
- Yamasaki M, Zhang R, Straus FH, Messina M, Robinson BG, Hashizume K, DeGroot LJ. 2002 Effective gene therapy for medullary thyroid carcinoma using recombinant adenovirus inducing tumor-specific expression of interleukin-12. *Gene Therapy* 9: 64-74.
- Yamazaki M, Straus FH, Messina M, Robinson BG, Takeda T, Hashizume K, DeGroot LJ. 2004 Adenovirus-mediated tumor specific combined gene therapy using herpes simplex virus thymidine/ganciclovir and murine interleukin-12 induces effective antitumor activity against medullary thyroid carcinoma. *Cancer Gene Ther* 11:8-15.
- Ye C, Feng C, Wang S, Liu X, Lin Y, Li M. 2002 Antiangiogenic and antitumor effects of endostatin on follicular thyroid carcinoma. *Endocrinol* 143: 3522-3528.
- Ye XH, Gao GP, Pabin C, Raper SE, Wilson JM 1998 Evaluating the potential of germ line transmission after intravenous administration of recombinant adenovirus in the C3H mouse. *Hum Gene Ther* 9:2135–2142.
- Yonezawa T, Furuhashi Y, Hirabayashi K, Suzuki M, Takahashi M, Nishihara M 2001 Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev* 60:196–201.
- Zatelli MC, Luchin A, Piccin D, Tagliati F, Bottoni A, Vignali C, Bondanelli M, Uberti EC. 2005 Cyclooxygenase-2 Inhibitors Reverse Chemoresistance Phenotype in Medullary Thyroid Carcinoma by a Permeability Glycoprotein-Mediated Mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 90(10): 5754-5760.

Zhang R, Minemura K, DeGroot LJ. 1998a Immunotherapy for Medullary Thyroid Carcinoma by a Replication-Defective Adenovirus Transducing Murine Interleukin-2. *Endocrinology* 139: 601-608.

Zhang R, Baunoch D, DeGroot LJ. 1998b Genetic immunotherapy for medullary thyroid carcinoma: destruction of tumors in mice by in vivo delivery of adenoviral vector transducing the murine interleukin-2 gene. *Thyroid*. 8: 1137-1146.

Zhang R, Straus FH, DeGroot LJ. 1999 Effective genetic therapy of established medullary thyroid carcinoma with murine interleukin-2: dissemination and cytotoxicity studies in a rat model. *Endocrinology* 140: 2152-2158.

Zhang R, DeGroot LJ. 2000a Gene Therapy of established medullary thyroid carcinoma with herpes simplex viral thymidine kinase in a rat tumor model: relationship of bystander effect and antitumor efficacy. *Thyroid*. 10:313-319.

Zhang R, DeGroot LJ. 2000b Genetic immunotherapy of established tumors with adenoviral vectors transducing murine interleukin-12 subunits in a rat medullary thyroid carcinoma model. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 52: 687-694.

Zhang R, Straus FH, DeGroot LJ. 2001a An adenoviral vector transducing tissue specific expression of thymidine kinase under the control of thyroglobulin promoter has high specificity and low toxicity in gene therapy. *Thyroid*. 11: 115-123.

Zhang R, DeGroot LJ. 2001b An adenoviral vector expressing functional heterogeneous proteins-Herpes simplex viral thymidine kinase and human interleukin-2 has enhanced in vivo antitumor activity in a medullary tumor. *Endocr Relat cancer* 8: 315-325.