Paulo Roberto Del Valle

**As vias de p53/ARF e interferon beta como alvos de terapia
gênica de carcinoma colorretal**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Bryan Eric Strauss

São Paulo

2018

Paulo Roberto Del Valle

**As vias de p53/ARF e interferon beta como alvos de terapia
gênica de carcinoma colorretal**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Bryan Eric Strauss

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Del Valle, Paulo Roberto

As vias de p53/ARF e interferon beta como alvos
de terapia gênica de carcinoma colorretal / Paulo
Roberto Del Valle. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: Bryan Eric Strauss.

Descritores: 1.Neoplasias colorretais 2.Terapia
gênica 3.Adenovírus humano 4.Imunoterapia 5.Genes
p53 6.Interferon beta 7.Células dendríticas

USP/FM/DBD-300/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Aos pacientes

Aos meus pais pelo suporte e apoio,

À minha família.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Bryan Eric Straus, por sua orientação, dedicação, e por compartilhar comigo o seu conhecimento, contribuindo grandemente para minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, por sua brilhante maneira de conseguir despertar em todos nós um imenso interesse pela ciência, pelas preciosas discussões e pela oportunidade de poder fazer parte do Centro Translacional em Oncologia do ICESP

Aos amigos Aline Hunger, Daniela Zanata, Igor de Luna, Marlous Lana, Rodrigo Tamura, Ruana Calado, Ruan Medrano, Samir Andrade, Taynah Ibrahim, Otto Cerqueira, Otavio Rodrigues, Fernanda Antunes, João Paulo Catani, Gissele Rolemberg, Thiago Salles pelas colaborações em diversos momentos, ajuda em todos os momentos de convivência e trabalho, e principalmente, pela amizade.

Aos Srs. Renan e Faiola, pelo suporte e apoio imprescindível à pesquisa que fornecem e pela dedicação com que executam todo o seu trabalho.

Às equipes de pesquisa do CTO e seus pesquisadores, em especial Renata Saito, Tharcisio Citrangulo e Silvina Bustos cuja convivência e compartilhamento de conhecimento facilitaram o desenvolvimento deste projeto.

Ao ICESP por sediar e fornecer todo o suporte necessário para a execução dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento deste projeto.

I also would like to thank Prof. Wafik-El Deiry, and all the people from his lab, for providing a huge opportunity with the internship abroad. He provided opportunities not only to improve my carrier, but also different aspects of my life.

To Prashanth Gokare, Turan Aghayev and Yulia Peshkova, for the all the support I could ever have, for all the rides, laughs and been the best companionship. Your friendship made me a better person.

To Ashish Mubarak and Lauren Kusant for been my family abroad, for the friendship, advices, prayers and giving me so much more than I deserve our could give back.

Aos meus pais Elias Marcos Del Valle e Lucia de Paula Souza Del Valle, e aos meus irmãos Tiago de Paula Souza Del Valle, Debora Del Valle de Carvalho e Denis Del Valle de Carvalho por todo o suporte, amor, carinho e incentivo para que esta jornada se concluísse.

A Deus, pelas suas misericórdias, pelo seu amor, pela sua graça.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas e Figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1 O Cancer como um problema global.....	1
1.2 Terapia gênica como uma opção para o tratamento do câncer	3
1.3 Controlando a expressão do transgene – o papel do promotor PG	6
1.4 O guardião do genoma – p53.....	7
1.5 Interferon- β e a terapia do câncer	10
1.6 A relação entre IFN β e o sistema imune	13
1.7 Laboratório de Vetores Virais ICESP – da terapia gênica à imunoterapia	14
1.8 O câncer colorretal como potencial alvo de terapia gênica de p53 e IFN β	16
2. Objetivos	19
Objetivos específicos:.....	19
4. Casuística e Métodos	20
4.1 Manutenção das linhagens celulares.....	20
4.2 Produção adenoviral	21
4.2.1 Amplificação do título viral.	21
4.2.2 Produção viral.	22
4.2.3 Purificação do lisado viral bruto.....	22
4.3 Ensaios de proliferação, ciclo e morte celular	24
4.4 Ensaios de RT-qPCR	24
4.5 Ensaio Clonogênico	25
4.6 Avaliação de marcadores de imunogenicidade	26
4.7 Obtenção de amostras de pacientes.....	26
4.7.1 Critérios de inclusão:.....	28
4.7.2 Critérios de exclusão:	28
4.7.3 Cultura primária de amostras cirúrgicas	28
4.7.4 Diferenciação de monócitos em células dendríticas.....	29

4.7.5 Avaliação funcional de células dendríticas co-cultivadas com células tumorais tratadas com a combinação	30
4.8 Análise Estatística	30
5. Resultados	31
5.1 Tolerância ao vetor e expressão dos transgenes.	31
5.2 Proliferação e viabilidade frente à combinação de vetores.....	37
5.3 Ensaio Clonogênico	40
5.4 Ciclo e morte celular	41
5.5 Mecanismos de Morte Celular	44
5.6 Ação transcricional e expressão de genes alvo	47
5.7 Combinação com Quimioterápicos	52
6. Discussão	55
7. Conclusão	61
9. Referências	62
9. Anexos	66

Lista de Abreviaturas

ATCC	– do Inglês <i>American Type Culture Collection</i>
Ca	– carcinoma
cDNA	– DNA complementar
cm ²	– centímetros quadrados
CO ₂	– Dióxido de carbono
°C	– graus Celsius
Cy3-dCTP	– 5-Amino-propargyl-2'-deoxycytina5'- trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy3 (verde)
Cy5-dCTP	– 5-Amino-propargyl-2'-deoxycytina5'- trifosfato acoplado a corante fluorescente Cy5 (vermelho)
DMEM	– Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMSO	– dimetilsulfóxido
DNA	– ácido desoxirribonucléico
dNTP	– desoxiribonucleotídeos
DTT	– ditioneitol
EGF	– fator de crescimento epidérmico
FGF	– fator de crescimento de fibroblasto
g	– força da gravidade (aceleração centrípeta)
M	– molar
mg	– miligrama
ml	– mililitro
mM	– milimolar
ng	– nanogramas
nm	– nanometro
N+	– Fibroblastos obtidos de metástase linfonodal
pb	– pares de bases
qRT-PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA	– ácido ribonucleico

RNA _m	– ácido ribonucleico mensageiro
rNTP	– ácido ribonucleico ribossomal
RPMI	– meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
RT	– enzima Transcriptase Reversa
RT-qPCR	– reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa.
TNM	– Tumor, Node and Metastatic.
UI	– Unidade internacional
UICC	– International Union Against Cancer
μg	– microgramas
μl	– microlitros
μM	– micromolar

Lista de Tabelas e Figuras

Figura 1. Ciclo do vetor adenoviral.	6
Figura 2. Viabilidade celular das linhagens após transdução com vetor adenoviral.	31
Figura 3. Observação de GFP como indicador da eficiência de transdução e nível de expressão.	32
Figura 4. Detecção de células GFP + em tempos crescentes após transdução.....	33
Figura 5. Western Blot para detecção de proteína p53.	34
Figura 6. Porcentagem e intensidade de expressão de GFP em diferentes MOIs.	35
Figura 7. Capacidade de transdução e expressão de GFP em outras linhagens celulares.	36
Figura 8. Validação da expressão dos transgenes de interesse.	37
Figura 9. Impacto do tratamento adenoviral em um painel de linhagens celulares.	38
Figura 10. Contagem de células após 72 horas de tratamento.....	38
Figura 11. Ensaio de viabilidade celular por MTT após 96h.....	39
Figura 12. Ensaio clonogênico.....	40
Figura 13. Viabilidade após 10 dias.....	41
Figura 14. Avaliação de células sub G1 e ciclo celular.....	43
Figura 15. Células positivas para Annexina V.	44
Figura 16. Células positivas para atividade de caspase 3 e 7.....	45
Figura 17. Células positivas para Calreticulina (CRT+).	46
Figura 18. Liberação de ATP no sobrenadante	47
Figura 19. Liberação de HMGB1 no sobrenadante.....	47
Figura 20. Expressão de genes na linhagem HCT116 p53+ (H+).	49
Figura 21. Expressão de genes na linhagem HCT116 p53-/- (H-).	50
Figura 22. Expressão de genes na linhagem HT29.....	51

Figura 23. Resposta das células HCT116 ao tratamento associado de transferência gênica e quimioterápicos.....	52
Figura 24. Resposta das células HCT116p53-/- ao tratamento associado de transferência gênica e quimioterápicos.	53
Figura 25. Resposta das células HT29 ao tratamento associado de transferência gênica e quimioterápicos.....	53
Figura 26. Ciclo celular na associação da terapia gênica com quimioterápicos.....	54

Resumo

Del Valle PR. *As vias de p53/Arf e interferon beta como alvos da terapia gênica do câncer colorretal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O câncer colorretal é o terceiro em mortalidade, e apesar das classificações moleculares, entre 30% e 40% dos pacientes apresentam recidiva após quimioterapia, o que aponta a necessidade de novas estratégias terapêuticas. É crescente o estudo de vetores virais para a terapia gênica do câncer, e dados do nosso laboratório mostraram que a entrega combinada dos genes Arf (supressor tumoral e parceiro funcional de p53) e interferon- β (IFN β , citocina imunomodulatória), via vetores adenovirais sob o controle do promotor responsivo à p53 causou indução de morte celular massiva e um efeito imunomodulatório importante. Entretanto, esses resultados foram observados em modelos murinos. O presente trabalho avalia como a combinação da modulação das vias de p53 e IFN β impacta células de carcinoma colorretal humano em ensaios *in vitro*. Para isto, utilizamos nosso adenovírus para transferir p53 (p53) e IFN β como uma estratégia combinada para induzir a morte celular na presença de um modulador imunológico. As linhas celulares HCT116, HCT116p53 $^{-/-}$ toleraram uma MOI (multiplicidade de infecção) de 25, enquanto uma MOI de 100 foi suportada por HT29 (mutante p53 R273H). O promotor PG, dependente de p53, como esperado, proporcionou níveis de expressão de GFP reduzidos em HCT116 p53 $^{-/-}$ e HT29, mas a expressão foi aumentada em todas as linhas celulares quando co-transduzida com o vetor codificando p53, mas não com IFN β . Em geral, HCT116 e HCT116p53 $^{-/-}$ foram mais sensíveis à transferência de p53, enquanto o HT29 foi particularmente afetado pela combinação de p53 + IFN β . Esta tendência refletiu-se na viabilidade celular (curva de crescimento, MTT), formação de colônias e acumulação de células hipodiplóides. Os níveis de morte celular correlacionaram-se com a atividade da caspase 3/7 e coloração com o Anexina V. Os marcadores de morte imunogênico ATP e calreticulina também foram aumentados, especialmente para o HT29 tratado com IFN β sozinho ou em combinação com p53. Além disso, observamos aumento da expressão de TP63, TP73, bem como alvos transcrpcionais de p53, como p21 e NOXA, enquanto SESTRIN foi reduzido em ambas as linhagens HCT, mas aumentou em HT29. Adicionalmente, testamos a combinação p53 + IFN β em associação com quimioterápicos, revelando cooperação entre a transferência gênica e a doxorrubicina ou 5-FU, mesmo nas menores doses testadas. Ensaios em andamento incluem a avaliação da ativação de células dendríticas humanas expostas para as células tumorais tratadas com os vetores portadores de p53 e/ou IFN β . Com este projeto, nossa abordagem de transferência gênica revelará a resposta aos transgenes em modelo humano e também abrirá o caminho para estudar o envolvimento do sistema imune humano.

Descritores: neoplasias colorretais; terapia gênica; adenovírus humano; imunoterapia; genes p53; interferon beta; células dendríticas.

Abstract

Del Valle PR. *P53/Arf and interferon beta pathways as colorectal cancer gene therapy targets* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Colorectal cancer is the third leading cause of cancer death and despite new molecular classifications, 30% to 40% of all patients will relapse after chemotherapy, pointing the need for new and innovative therapeutic strategies. The number of studies about viral vectors for gene therapy is growing, and previous data from our laboratory indicates that the combined delivery of Arf (a tumor suppressor gene and functional partner of p53) and interferon beta (IFN β , an immunomodulator cytokine), under a p53 responsive promoter, induced massive cell death and an important immunomodulatory effect. However, these results were only observed in murine models. Here we present an RGD-modified adenovirus whose transgene is under the control of a p53 responsive promoter (PG), used to transfer p53 (p53) and IFN β as a combined strategy to induce cell death in the presence of an immune modulator. Cell lines HCT116, HCT116 p53 $^{-/-}$ tolerated a MOI (multiplicity of infection) of 25, while a MOI of 100 was supported by HT29 (mutant p53 R273H). The p53-dependent PG promoter, as expected, provided reduced GFP expression levels in HCT116 p53 $^{-/-}$ and HT29, but the expression was increased in all cell lines when co-transduced with the p53 vector, but not with IFN β . In general, HCT116 and HCT116p53 $^{-/-}$ were more sensitive to p53 gene transfer while HT29 was particularly affected by the combination of p53 + IFN β . This trend was reflected in cell viability (growth curve, MTT), colony formation and accumulation of hypodiploid cells. Levels of cell death correlated with caspase 3/7 activity and staining with Annexin V. Immunogenic markers were also increased, especially for HT29 treated with IFN β and p53/IFN β , as we detected exposure of calreticulin and release of ATP. Also, we observed increased expression of TP63, TP73 as well as p53 transcriptional targets, such as p21 and NOXA; SESTRIN was reduced in both HCTs but increased in HT29. Additionally, we tested the p53+IFN β combination in association with chemotherapeutics, revealing cooperation between gene transfer and doxorubicin or 5-FU even at the lowest doses tested. Ongoing studies include the evaluation of human dendritic cells exposed to tumor cells treated with the vectors for p53/IFN β . In conclusion, our combined gene transfer approach has potentiated the killing of colorectal cancer cell lines and may provide an immunomodulatory effect.

Descriptors: colorectal neoplasm; gene therapy; adenoviruses, human; immunotherapy; genes, p53; interferon-beta; dendritic cells.

1. Introdução

Neste trabalho, iniciaremos localizando o problema em questão, no caso câncer, como sendo de abrangência global e complexo, o qual se exige várias estratégias em sua abordagem. A seguir apresentaremos a terapia gênica como uma opção promissora para o câncer, falaremos da estrutura do vetor de interesse neste trabalho e como direcionamos a expressão dos transgenes através de um promotor PG. A seguir, abordaremos a importância de cada um dos transgenes, no caso o p53 e o IFN β . Neste contexto, apresentaremos um pouco os trabalhos e a linha de pesquisa do laboratório de vetores virais, e as contribuições do autor em trabalhos anteriores. Por último, expomos o câncer colorretal como um possível alvo desta terapia gênica, o racional desta combinação de genes neste modelo e assim apresentado o racional que deu origem à elaboração de nossa hipótese.

1.1 O Cancer como um problema global

O câncer encontra-se entre as doenças de maior mortalidade e com o número de novos casos dobrando a cada 25 anos, as previsões para 2030 estimam cerca de 22 milhões de novos casos e um total de 13 milhões de mortes por essa doença ao redor do mundo (1). Por isso, no dia mundial do câncer em 2013, o Fórum Mundial de Oncologia lançou um apelo à sociedade chamado “Stop Cancer Now!” onde destaca o papel da prevenção, tratamento adequado e o suporte dos pacientes. Ademais, foi ressaltada a necessidade de desenvolvimento de novos recursos terapêuticos, visto que os métodos atuais ainda não são capazes de mudar essas estimativas (2).

Alguns fatos ressaltam a importância desta doença, sendo ela a segunda causa líder de morte global, responsável por 8.8 milhões de mortes no mundo em 2015, com aproximadamente um em cada seis mortes sendo causadas por câncer. Chama ainda a atenção que aproximadamente 70% destas mortes ocorrem em países de baixa e média renda. O que deve ser destacado é que cerca de um terço das mortes de câncer estão relacionados a estes cinco principais comportamentos e dietas de risco, como alto índice de massa corpórea, baixo consumo de frutas e vegetais, falta de atividade física, uso de tabaco e uso de álcool (3).

Ainda dentro dos fatores de risco, o uso de tabaco é considerado o mais importantes, sendo responsável por aproximadamente 22% das mortes por câncer (4). Entretanto infecções causadoras de câncer, como hepatite e HPV (*human papiloma virus*) ainda despontam-se como causa de pelo menos 25% dos casos em países de baixa e média renda (5).

Diagnóstico tardio ou inacessível, como também a falta de tratamentos disponíveis se mostram como fatores agravantes e aumentam ainda mais a chance de morte, além dos fatores de risco relacionados às causas desta doença. Em 2017, apenas 26% dos países de baixa renda reportaram possuir serviços de patologia amplamente disponíveis no setor público. E enquanto mais de 90% dos países de alta renda possuem tratamentos disponíveis, isso é verdade para menos de 30% dos países de baixa renda (3).

Como se apenas a perda humana não fosse um suficiente argumento para se investir em melhor prevenção e tratamento, o impacto desta doença é muito mais profundo quando observado do ponto de vista econômico. O custo total

anual relacionado ao câncer em 2010 foi estimado em aproximadamente US\$ 1.16 trilhões (6). Sendo que apenas 20% dos países de baixa renda possuem dados necessários para direcionar uma política adequada de combate ao câncer (7).

1.2 Terapia gênica como uma opção para o tratamento do câncer

Visto que o câncer é um conjunto de doenças, altamente diverso e complexo, e que quando não tratado adequadamente tem um desfecho fatal, é de se esperar que sua abordagem terapêutica também seja complexa e diversa. Entre as opções terapêuticas com alto potencial está a terapia gênica, com o exemplo das células T modificadas com receptor de antígeno quimérico ("*chimeric antigen receptor*" - CAR-T cells), que visam inserir um receptor modificado nas células T dos pacientes, ganhando destaque não apenas na literatura científica, mas alcançando até o público leigo (8, 9).

Dentro dessa perspectiva, a terapia gênica tem se mostrado uma estratégia promissora. Até novembro de 2017 foram registrados 1.688 estudos direcionados ao tratamento do câncer, representando 65% do total de estudos clínicos em terapia gênica. Entre os vetores utilizados, o adenovírus é o mais empregado para a transferência gênica, sendo este registrado em 547 estudos clínicos contra o câncer (10, 11).

Vetores derivados de adenovírus são vantajosos, pois podem gerar altos títulos (em torno de 10×10^{12} partículas/ml), podem transduzir uma grande variedade de células; não dependem do estado replicativo das células para a transdução; apresentam baixa patogenicidade em seres humanos; podem

suportar grandes inserções em seus genomas (até 35 Kb) e por fim, não integram o DNA da célula hospedeira, não causando mutações insercionais ou alterações não controladas na expressão gênica (12, 13).

O adenovírus possui um capsídeo não envelopado onde abriga o seu genoma de DNA dupla fita. O capsídeo, de formato icosaédrico, é composto por 12 cópias da proteína trimérica hexon, estando cada um dos seus vértice localizada a proteína base pentônica, de onde se estende a proteína da fibra, que possui em sua extremidade C-terminal uma porção globular (*knob*). O seu genoma pode variar de 26 a 40 Kb, dependendo do sorotipo. Em cada extremidade do genoma encontram-se as origens de replicação chamadas ITR (*inverted terminal repeats*), próximo ao ITR esquerdo está a o sinal de empacotamento, necessário para a internalização do genoma no capsídeo. As outras partes do genoma dividem-se entre os genes expressos na fase inicial (*early* - E) e os da fase tardia (*late* - L) (14).

As primeiras gerações de adenovírus recombinante para aplicação como vetor foram construídas com deleções das regiões E1 e E3. Estas regiões induzem a célula a entrar na fase S (para replicação do genoma viral) e inibem a indução de apoptose (E1) e codificam proteínas que bloqueiam a resposta natural da célula contra infecções virais (E3) (14).

Entretanto, alguns desafios ainda precisam ser superados na utilização dos adenovírus, principalmente quando administrados por via sistêmica, como aumentar a eficiência de transdução ou especificidade para a célula alvo, evasão de imunidade pré-existente contra o vírus, superar a ligação aos componentes do sangue, além de anticorpos, que podem alterar sua biodistribuição *in vivo*

(15). Entretanto, diversos estudos mostraram possíveis soluções como modificações em algumas proteínas do capsídeo, produção de vírus químera, ou ainda utilização de veículos como células tronco mesenquimais ou microbolhas (15-17).

A primeira etapa para a transdução do vírus e entrega do material genético se dá pela interação do vírus com o receptor na membrana da célula hospedeira. A maioria dos adenovírus interage com a proteína CAR (*coxsackie and adenovirus receptor*), através de seu *knob* da proteína da fibra; posteriormente interações entre integrinas e as proteínas *penton* da base estabilizam a interação e permitem a internalização da partícula viral através de vesículas de clatrina (12). Entretanto, a diversidade de expressão do receptor CAR entre os tecidos pode explicar as diferentes taxas de eficiência de transdução do vírus.

Sendo assim, a inserção do tri peptídeo RGD (Arg-Gly-Asp) no *knob* da fibra altera o tropismo do receptor, sendo este direcionado às integrinas (presentes em diversos tipos celulares). Essa modificação permitiu que células de glioma fossem transduzidas com uma eficiência 100 vezes maior que o vírus selvagem (18). Recentemente, essa inserção do tri peptídeo RGD também foi utilizada em nosso grupo para construir os vetores AdRGD e quando testado, o vetor AdRDG-eGFP (gene repórter *green fluorescent protein*) transduziu eficientemente células de melanoma murino B16F10 selvagens, que não expressam o receptor CAR e por isso não eram transduzidas por adenovírus do sorotipo cinco, mostrando uma transdução independente de CAR (19).

Após a ligação com o receptor, a partícula viral é internalizada por endocitose dependente de receptor e direcionada ao endossomo. Após a perda das proteínas da fibra e escape do endossomo, a partícula viral entra em um processo de desmontagem o qual direciona o seu DNA dupla fita diretamente ao núcleo. Sendo assim, o genoma viral permanece no núcleo como DNA extra cromossomal resultando na expressão transiente do transgene (20).

Figura 1. Ciclo do vetor adenoviral. Após a interação das proteínas da fibra viral com seus receptores na membrana, este é internalizado via endossomo, onde perde as proteínas da fibra. Com o rompimento do endossomo, o capsídeo viral é transportado até o núcleo onde ele insere seu material genético. CAR - *coxsackievirus and adenovirus receptor*. Adaptado de (20)

1.3 Controlando a expressão do transgene – o papel do promotor PG

Uma das maneiras de direcionar a especificidade do vírus é através de modificações nos promotores responsáveis pela expressão do transgene. Neste

caso, nosso grupo desenvolveu promotor responsivo à proteína supressora de tumor p53, denominado PG. Este elemento de resposta foi inicialmente isolado do “*ribosomal gene cluster*” (RGC), e adaptado para possuir 13 elementos responsivos RGC (21, 22). Inicialmente desenvolvido em vetores retrovirais, a inserção deste promotor permitiu uma expressão até oito vezes maior do transgene, quando comparado com vetor parental (23, 24). Para a utilização em vetores adenovirais, além da sequência PG (responsiva à p53), foram também adicionados um promotor mínimo derivado da região E1B do vetor adenoviral (Tx), a fim de aumentar o controle transcricional, e uma sequência intrônica (β) derivada do gene da β -globina de coelho, a fim de aumentar a regulação pós transcricional, resultando no aumento da expressão do transgene pelo promotor sintético PGTx β (25).

A estratégia de se ter um promotor responsivo à p53 baseia-se no fato de que a maioria dos quimioterápicos, bem como as diversas terapias gênicas, recaem na ativação desta via. E não é por falta de propósito que boa parte das estratégias terapêuticas para o câncer promova a ativação de p53, visto que ele é conhecido como o grande guardião da integridade do genoma (26).

1.4 O guardião do genoma – p53

A proteína p53 é um fator de transcrição de vida curta que controla a expressão de diversos genes descritos como importantes para indução de apoptose, parada no ciclo celular, senescência, regulação da glicólise, autofagia, reparo de danos genotóxicos, sobrevivência celular, regulação do estresse oxidativo, invasão, motilidade, angiogênese, diferenciação e remodelamento

ósseo (27). Além da ação transcricional, p53 pode possuir uma ação citoplasmática importante. Com funções semelhantes ao grupo de proteínas BH3, foram propostos alguns modelos para descrever como p53 pode interferir nas interações entre proteínas anti e pró-apoptóticas, liberando ou ativando Bad e Bak para permeabilizarem a membrana mitocondrial a fim de induzir apoptose (28).

A indução e ativação de p53 ocorrem em resposta ao estresse celular. Em condições normais, p53 mantém-se em baixos níveis citoplasmáticos pela ação de ubiquitinas ligases, principalmente pela MDM2 (que também tem sua transcrição induzida por p53), que direciona a proteína p53 para degradação no proteassoma. Já em condições de estresse ou sinais hiperproliferativos, têm-se a ativação da ação de p53 pelo aumento da proteína ARF (*alternate reading frame* do gene *CDKN2a*), que pode atuar ou inativando a atividade ubiquitina ligase de MDM2, ou desfazendo a interação p53-MDM2, ou ainda sequestrando MDM2 para o nucléolo, separando-o da p53 presente no nucleoplasma (29). Por isso, não é incomum observar alterações tais como mutações, deleções ou hipermetilação de ARF correlacionando-se com pior prognóstico em pacientes de diversos tipos de tumores (30).

Além de sua função em ativar p53, Arf pode ter funções independentes de p53. Foi observado que o aumento da expressão de Arf pode induzir parada de ciclo celular e indução de apoptose em células que não expressam ou perderam p53. Também foi descrito que Arf pode alterar o padrão de ativação transcricional de Myc e E2F1, ou inibindo ou alterando o padrão de genes ativados por esses fatores de transcrição. Também foi observado que

camundongos *knockout* para p53, MDM2 e p19^{Arf} são mais propensos a desenvolver tumores quando comparados com os *knockout* apenas para p53 e MDM2 (30).

Por isso, como estratégia de tratamento do câncer torna-se interessante restabelecer a função ou via de p53 mediante a transferência do gene p19^{Arf} (murino) ou p14^{Arf} (humano). Assim, um estudo anterior de nosso grupo avaliou os efeitos antiproliferativos da combinação do vetor retroviral pCLPGp19^{Arf} e nutlin-3 (inibidor da interação p53-MDM2) em linhagens com p53 selvagens C6 (glioma murino) e B16F10 (melanoma murino). *In vivo*, tumores de B16F10 requereram a reposição de Arf pelo vetor pCLPGp19^{Arf} e nutlin-3 para indução de necrose e redução da marcação de BrdU, enquanto células C6 foram suscetíveis a ambos os tratamentos individualmente (31).

Apesar de ser crucial na fisiologia celular, p53 frequentemente está alterado em câncer, apontando como um dos genes mais mutados, o que em alguns casos torna difícil sua reativação. Cerca de 42% de tumores analisados apresentaram mutações, sendo os mais frequentes carcinoma seroso de ovário (94,6%), carcinoma de célula escamosa de pulmão (79,3%), carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço (69,8%) e glioblastoma (28,3%). A maioria das mutações de p53 são missenses localizados no domínio de ligação de DNA, sendo que a maioria destas mutações interrompem a interação de p53 com o DNA. A maioria das mutações que alteram a função supressora tumoral altera a energia livre da proteína, levando a uma desestabilização de sua estrutura, sendo então as mutações classificadas como mutantes de contato-DNA e mutantes estruturais. Apesar destas mutações, existe uma crescente gama de

compostos que buscam reestabelecer as funções de p53 mutado, estabilizando sua conformação e reativando sua ação transcricional, como PRIMA-1, APR-246, COTI-2 entre outros (32). Entretanto pouca ou nenhuma opção farmacológica existe para mutações que leva a proteínas truncadas ou deleções, apesar de serem pouco frequentes.

Tendo em vista a importância de p53, não é surpresa existirem grupos de pesquisa interessados em restaurar a expressão de p53 utilizando vetores virais. Digno de destaque são os casos do Gencidine (rAdp53) e do controverso H101 (CRAdp53 – oncolítico com replicação apenas em células p53 mutadas) que não transfere p53, e cuja seletividade para p53 mutado ainda é questionada(33), as primeiras terapias gênicas aprovadas no mundo, na China. Entretanto pouco se sabe sobre os critérios de aprovação, segurança e eficácia destes produtos, visto que a maior parte das publicações está em chinês ou são revisões traduzidas para o inglês (34) apesar de ser arguido que mais de 30 mil pacientes já foram tratados em revisões mais recentes(35, 36).

1.5 Interferon- β e a terapia do câncer

Outra proteína que pode ter um papel importante na ativação de p53 e indução de apoptose é a citocina interferon- β (IFN β). Foi descrito que tanto a transcrição quanto os níveis proteicos de p53 são aumentados em resposta ao IFN β , sendo essa interação importante tanto na eliminação por apoptose de células infectadas com vírus quanto na supressão tumoral (37).

Inicialmente descrita pela função antiviral, a família dos interferons também se tornou conhecida por suas ações pró-apoptóticas antitumorais. IFN β ,

pertencente aos interferons do tipo I, é uma glicoproteína secretada que possui tanto ação autócrina quanto parácrina, exercida pela interação com seu receptor de membrana, constituído por duas cadeias (IFNAR1 e IFAR2). A interação ligante-receptor ativa a cascata de transdução de sinal JAK-STAT, ativando Stat1, Stat2, Tyk2 e Jak1, levando à formação do complexo STAT1/STAT2/IRF9 o qual se transloca para o núcleo levando a ativação transcricional de genes que possuem o elemento de resposta ao interferon (ISRE) em seu promotor (38). Foram descritos mais de 2000 genes responsivos ao interferon, os quais possuem diversas ações como regulação de crescimento, diferenciação, proliferação, sobrevivência, apoptose, mobilidade, além das funções imunomoduladoras (39).

Assim, os efeitos antitumorais de IFN β vão além da relação com p53. Células endoteliais podem ser suscetíveis à ação de IFN β , levando a uma diminuição do aporte vascular tumoral. Além disso, foi mostrado que a via de sobrevivência PI3K/AKT pode ser suprimida pela ação de IFN β , correlacionando com a morte de células de neuroblastoma e câncer colorretal. Adicionalmente, a via de morte dependente de mitocôndria pode ser acionada pela ativação de ERK1/2 e JNK levando à ativação de proteínas pró-apoptóticas membros da família Bcl-2, como Bax e Bad (40).

Interferons do tipo I, principalmente o IFN α recombinante, já possui utilização clínica em alguns tipos de tumores como melanoma metastático. O seu uso no tratamento de certas leucemias possibilitou as primeiras chances de remissão da doença, porém com o avanço no tratamento farmacológico, o uso do interferon foi descontinuado para a maioria desses pacientes, devido à

toxicidade e ao surgimento de terapias alvo como Imatinib para leucemia mielóide crônica. Adicionalmente, existem evidências de benefícios clínicos em outros tipos de tumores, como carcinoma de células renais, sarcoma de Kaposi, linfoma de células T cutâneo, osteosarcoma, carcinoma de células basais entre outros(41). O uso de IFN β em pacientes com diagnóstico recente de glioblastoma primário, em associação com temozolomida também mostrou um benefício superior ao quimioterápico padrão (42). Além disso, para pacientes com tumores neuroendócrinos gastro-entero-pancreáticos, interferon- α pode ser administrado juntamente com análogos de somatostatina e bioterapia para controle dos sintomas derivados da liberação de hormônios e crescimento celular (43). Entretanto o uso de IFN é associado a diversos efeitos adversos como fadiga, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, disfunções endócrinas e hematológicas o que pode trazer certas restrições ao seu uso sistêmico (44).

Também é esperado encontrarmos na literatura relatos de terapia gênica para entrega de IFN β , especialmente usando adenovirus. Grupos chineses estudam adenovírus oncolíticos armados com IFN β (45) ou apenas vetor adenoviral com IFN β (46) em modelos *in vitro* de câncer de esôfago, mama e hepático. Um grupo da Filadélfia (PA. USA), que há 20 anos estuda vetores adenovirais para interferons do tipo um, em 2016 abriu um ensaio clínico de fase I para vetor adenoviral interferon- α associado à cirurgia em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas ressecável (47).

O envolvimento da família do interferon com o sistema imune também tem sido intensamente estudado, principalmente no contexto de uma ativação imune antitumoral. Foi demonstrado que inibição de IFN do tipo I pode evitar a rejeição

de sarcomas em modelos murinos e ainda, camundongos que não expressam o receptor de IFN (IFNAR1) são mais suscetíveis à formação de tumores induzida por carcinógeno. Ademais, foi demonstrado que a eliminação de tumores é dependente de células do sistema hematopoiético sensíveis aos IFN do tipo I (48).

1.6 A relação entre IFN β e o sistema imune

Entre as células do sistema imune que possuem um papel central na resposta antitumoral mediada por interferon destacam-se as células dendríticas (DC). Estas células possuem um alto nível de plasticidade, de modo que sua classificação, baseada apenas em parâmetros moleculares, pode muitas vezes ser controversa. Entretanto, a forma como DCs modulam a resposta imune pode defini-las como imunogênicas ou tolerogênicas. DCs tolerogênicas são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos *naïve* em células T reguladoras (Treg), possuem baixa expressão de moléculas imunoestimulatórias, como CD40, CD80 e CD86 e alta expressão de receptores inibitórios como ILTs (*immunoglobulin-like transcripts*). Em contrapartida, DCs imunogênicas são capazes de ativar células T efetoras, e quando em contato com IFN do tipo I, podem ativar a expressão de moléculas de MHC de classe II, moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 e os marcadores de maturação CD40 e CD83 (49).

Em fases iniciais, e como parte da proteção contra o desenvolvimento de tumores, as DCs são capazes de captar antígenos tumorais de debris celulares derivados do reconhecimento do tumor por células do sistema inato de defesa, como NKs (*natural killers*). Após o contato com os antígenos tumorais, as DCs

entram em processo de maturação e migram para o órgão linfoide drenante, onde apresentam os antígenos às células T *naïves*, levando à diferenciação destas células em células T efectoras, as quais são capazes de reconhecer e eliminar o tumor (50).

Porém, ao longo do desenvolvimento tumoral, o câncer pode gerar um ambiente imunossupressor capaz de inibir a maturação de DC, como observado pela maturação reduzida de células dendríticas após o contato com o meio condicionado de explantes de tumores colorretais, rico em CCL2, CXCL1, CXCL5 e VEGF (51). Por outro lado, não está claro se as DCs de pacientes com câncer são intrinsecamente tendenciosas a gerar uma resposta tolerogênica ou se essa tendência é resultado da interação tumor-microambiente, pois DC derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama possuem a preferência em desenvolver Tregs (células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺), independente do estímulo de maturação das DCs (52).

1.7 Laboratório de Vetores Virais ICESP – da terapia gênica à imunoterapia

O Laboratório de Vetores Virais tem sua pesquisa focada na utilização de vetores não replicativos para a entrega de um gene supressor tumoral associado a um gene imunomodulador. O objetivo seria induzir tanto morte celular como resposta imunológica, alterando assim o microambiente tumoral de forma a permitir o desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral.

Sendo assim, nosso grupo também desenvolveu um vetor adenoviral que expressa IFN β sob o controle do promotor PGTX β , denominado AdPGIFN β . A

possibilidade de se combinar a entrega simultânea de IFN β e Arf tem se mostrado uma estratégia promissora, visto que além de IFN β induzir uma resposta imune antitumoral, seus efeitos apoptóticos também podem ser dependentes de Arf (53).

O potencial terapêutico dos dois genes, p19Arf e IFN β , tem sido demonstrado em linhagem de melanoma murino B16F10 e carcinoma de pulmão murino LLC. A transdução combinada dos dois genes causou a indução de grande acúmulo de células hipodiplóides (sub-G1) *in vitro*. Além disso, as marcações de annexina V e caspase três clivada mostraram um mecanismo de morte compatível com apoptose. Concordantemente, em modelos *in vivo*, a injeção intratumoral tanto de IFN β ou p19Arf/IFN β levaram à inibição do crescimento tumoral, sendo apenas a combinação associada ao aumento de morte celular e aumento de sobrevida (54).

Visto que a combinação p19Arf e IFN β em modelos murinos tem se mostrado importante, foi necessário entender alguns aspectos mecanísticos desencadeados por esta combinação. Sendo assim, o foi interessante observarmos as alterações causadas no perfil transcricional induzido pelos vetores. Inicialmente avaliamos as alterações desta combinação em linhagem de melanoma B16F10, onde observamos alterações específicas para cada tratamento. Entre as vias observadas, genes envolvidos em resposta imune, resposta aos vírus e processamento de antígeno foram fortemente regulados nos genes mais expressos quando tratados com vetores para IFN β ou combinação p19Arf/IFN β . Em contrapartida genes envolvidos na via de sinalização de p53 e apoptose foram regulados entre os genes mais expressos

no tratamento p19Arf e na combinação p19Arf/IFN β . Estes resultados mostraram um padrão molecular para a indução de morte celular compatível com o reestabelecimento da via apoptótica de p53/Arf na presença de resposta antiviral induzida por IFN β , demonstrando a cooperação entre as duas vias (55).

Avaliamos também o perfil transcricional desta terapia em outro modelo murino *in vivo* de carcinoma de pulmão utilizando a linhagem LLC. Os tumores tratados apresentaram 75 e 87 genes mais e menos expressos respectivamente, os quais levaram ao enriquecimento de vias associadas à resposta imune e quimiotaxia, sugerindo o envolvimento de neutrófilos e células T (56).

1.8 O câncer colorretal como potencial alvo de terapia gênica de p53 e IFN β

No caso do câncer colorretal, o terceiro câncer mais frequente no mundo, o sistema imunológico desempenha um importante papel no desenvolvimento e progressão da doença (57). Apesar de vários grupos mostrarem divergentes classificações moleculares, é aceito o consenso de classificação molecular que subdivide o câncer colorretal em quatro subtipos: CMS1 (*consensus molecular subtype 1*) representa 14% dos casos, caracterizado por instabilidade de microssatélites, hipermutação, e forte ativação do sistema imune. CMS2, canônico, representando 32% dos casos, de característica epitelial com forte sinalização ativada de WNT e MYC; CMS3, chamado de metabólico e representando 13% dos casos, de origem epitelial e com clara alteração metabólica; CMS4, mesenquimal e representando 23% dos casos, com ativação proeminente de da via de TGF- β , invasão estromal e angiogênese. Ainda, amostras com características mistas representam 13% dos casos, e

possivelmente são um reflexo de fenótipo de transição ou heterogeneidade intratumoral (58). Apesar disso, entre 30% a 40% dos pacientes apresentaram recidiva, independente do subgrupo (59) e a chance de sobreviver além dos cinco anos após a doença é de apenas 12% (60).

Vale destacar que tumores do tipo CMS1, com instabilidade de microssatélites, estão associados a uma resposta imune robusta, com uma alta presença de linfócitos infiltrantes de tumor, especialmente CD8+ e de células de memória CD45RO+, ambos indicativos de bom prognóstico. Apesar de altamente imunogênico, este tumor não é eliminado espontaneamente, indicando possíveis mecanismos de evasão utilizados pelo tumor (61). De fato, estes tumores apresentaram respostas interessantes aos “*checkpoint blockades*”, sendo a terapia anti-PDL-1 aprovada para pacientes apresentando instabilidade de microssatélites refratário à terapia convencional (62, 63).

Por outro lado, a caracterização do infiltrado imune pode se correlacionar com prognóstico, como observado pela presença de DCs encontrada principalmente nos estágios iniciais da doença (64). Ademais, a presença de marcadores de resposta imune citotóxica (CD8+ e CD45RO+) foi associada ao melhor prognóstico, assim como a presença de células imunossupressoras FOXP3+ Treg geralmente associada ao pior prognóstico tanto em tumores colorretais (65) quanto gástricos(66).

Entretanto, mesmo com indícios de uma ação do sistema imunológico sobre o carcinoma colorretal, ainda não está bem estabelecida a capacidade de terapias imuno estimulatórias, como a combinação p53 e IFN β , de invocar uma resposta imune antitumoral contra essas células. Sendo assim, avaliaremos esta

combinação em linhagens colorretal HCT116, HCT116p53^{-/-} e HT29 (p53 mutada R273H) quanto ao potencial efeito terapêutico.

2. Objetivos

Avaliar os efeitos antitumorais da combinação p53 e IFN β em linhagens de carcinoma colorretal humano HCT116, HCT116^{p53-/-} e HT29.

Objetivos específicos:

- a. Estabelecer as condições de transdução;
- b. Determinar a toxicidade do vetor;
- c. Avaliar proliferação, ciclo e morte celular;
- d. Avaliar efeitos na expressão de alguns genes alvos;
- e. Avaliar marcadores de imunogenicidade;
- f. Avaliar combinações com quimioterápicos;
- g. Usar modelos *ex vivo* para explorar resposta imune;

4. Casuística e Métodos

A construção dos vetores virais foi realizada em trabalhos prévios do grupo, sendo descritos apenas os procedimentos para a produção dos vetores. Os vetores construídos e que foram utilizados são AdRGD-PGeGFP (*Green Fluorescent Protein*); AdRGD-PGLuc (Luciferase) AdRGD-PGp53 (p53); AdRGD-PGINF β (Interferon β).

4.1 Manutenção das linhagens celulares.

A linhagem transformada HEK293A (human embryonic kidney 293) foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO-BRL, Grand Island, New York, EUA) suplementado com 10% de BCS (*bovine calf serum*) *Hyclone Defined*, (*Hyclone, Logan Utah*, EUA), 50 μ g/mL de gentamicina, 25 μ g/mL de ampicilina e 2,5 μ g/mL de fungizona (anfotericina B), sendo mantida a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As linhagens HCT116, HCT116p53^{-/-} e HT29 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO-BRL, Grand Island, New York, EUA) e suplementados com 10% de FBS (GIBCO-BRL, Grand Island, New York, EUA) e suplementado com antibióticos como descrito acima.

4.2 Produção adenoviral

4.2.1 Amplificação do título viral.

Células HEK293 foram cultivadas a $7,5 \times 10^5$ em placas de cultura de 6 cm e incubadas (37°C, 5% CO₂) por 24 horas em meio DMEM contendo 5% de BCS. Para a transfecção foram utilizados 5 µg do vetor adenoviral recombinante linearizado (através de digestão com *PacI*) adicionados a 250 µL de cloreto de cálcio (0,25 M) e precipitado através da adição de 250 µL do tampão fosfato de sódio/HEPES HBS-2X pH 7,05 (cloreto de sódio 274 mM, HEPES 40 mM, fosfato monoácido de sódio 2,8 mM). A suspensão contendo o precipitado de DNA foi gotejada sobre o meio de cultura das células plaqueadas e as células foram incubadas por 4 horas. Em seguida, as células foram submetidas a um choque de glicerol, o qual consiste em tratá-las com PBS 1X contendo 15% de glicerol durante 3 minutos, e após lavá-las com PBS 1X, sendo que, em seguida, adicionar-se-á meio DMEM com 5% de BCS às células. Após sete dias, a coleta inicial de vírus foi realizada utilizando o método de congela-descongela, no qual as células e o sobrenadante da placa foram coletados e passados para um tubo e submetidos a ciclos de congelamento em gelo seco seguido por banho a 37°C, por três vezes consecutivas. Após esse processo a amostra foi centrifugada (4000 rpm, 5 min, 4°C), o sobrenadante (lisado viral) foi coletado, aliquotado e armazenado a -80°C.

A 1ª amplificação viral foi feita através da transdução do lisado viral em 5×10^5 células HEK293 em placas 3,5 cm. As células permanecerão em cultura por aproximadamente sete dias para que, após, os vírus sejam coletados através do método de congela-descongela. Esse processo foi repetido em placa 6 cm

contendo $7,5 \times 10^5$ células HEK293 (2ª amplificação) e depois passado para placas de 10 cm contendo $1,0 \times 10^6$ células (3ª amplificação em diante) até que seja observado o efeito citopático.

4.2.2 Produção viral.

Para a produção adenoviral, 25 placas de 150 mm contendo HEK293 com 75% de confluência são infectadas com o lisado viral da última etapa de amplificação (quando foi possível a observação do efeito citopático causado pelo vírus). Cada placa é mantida por 1 hora com 4 mL de meio DMEM 2% contendo uma quantidade de lisado viral determinada para causar efeito citopático entre 48 e 96 horas. Após esse período, completa-se a quantidade de meio DMEM 2% das placas para 30 ml e essas são mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até que metade das células da placa esteja em suspensão devido ao efeito citopático e a outra metade aderida à placa, porém já apresentando morfologia circular. Nesse momento, desprega-se as células mecanicamente e coleta-se em tubos de 50 ml. Após, centrifuga-se o conteúdo coletado a 2500 rpm por 10 min, descarta-se o sobrenadante e ressuspende-se as células em 4 ml de meio DMEM para que elas sejam lisadas através do método de congelamento-descongelamento. Através de mais uma centrifugação para separar os restos celulares, obtém-se o lisado viral bruto que deve ser purificado para ser utilizado.

4.2.3 Purificação do lisado viral bruto.

Para a purificação, aplica-se o lisado viral bruto em um gradiente de iodixanol para ultracentrifugação. Esse gradiente consiste das seguintes soluções adicionadas cuidadosamente a tubos Beckman claros 14x89mm (Cat. Nº 344059), seguindo-se a ordem da solução mais concentrada, na parte inferior do tubo, para a solução menos concentrada, na parte superior: 0,5 ml de 54% (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 ml de 40% (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 ml de 25% (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 ml de 15% (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 ml de 15% (w/v) iodixanol em PBS contendo 1 M NaCl, 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl. Aplica-se cuidadosamente o lisado viral bruto (aproximadamente 4 ml) em cima do gradiente e o tubo é então centrifugado a 35000 rpm usando um rotor sorvall swing bucket (Rotor Sorvall TH-G41) por 1 h a 10°C. Os adenovírus formam uma banda clara na interface das soluções de densidade de 25% e 40%. A banda foi removida com uma seringa, perfurando o tubo um pouco abaixo desta para não perturbá-la, e inserida em colunas PD-10 desalting contendo resina SephadexTM G-25 (GE, Cat. Nº 52-1308-00 BB). Antes de inserir a banda viral nas colunas, essas devem ser preparadas equilibrando-as com 25 ml de PBS 1X. Após inserir-se a banda viral na coluna, deve-se esperar que o líquido entre nela completamente antes de eluir o vírus purificado. Para a eluição do vírus, insere-se aos poucos PBS 1X na coluna e coleta-se o eluente. Dessa forma, quando o eluente passar a apresentar uma coloração esbranquiçada, deve-se coletá-lo e estocá-lo com 7 % de glicerol a -80°C. Esse estoque consiste da preparação viral purificada, a qual deve ser titulada com o kit Adeno-X Rapid Titer (Clontech, Cat. Nº 632250) para ser utilizada nos ensaios.

4.3 Ensaios de proliferação, ciclo e morte celular

Primeiramente as linhagens celulares foram transduzidas com os vetores isolados, ou a combinação p53 e INF β . Para ensaios de citotoxicidade, foi realizado uma curva com diferentes MOIs de cada vírus, em placas de 96 poços, e avaliados em 24h, 48h e 72h pelo ensaio de MTT e contagem com exclusão de azul de tripan. Para os ensaios de ciclo celular, as células foram semeadas em placas de seis poços e incubadas por 48h, 72h e 96h e então fixadas em etanol 70%, após centrifugação e lavagem com solução salina, as células foram incubadas em solução salina tamponada com fosfato contendo iodeto de propídeo (20 μ g/ml) e RNase A (40 μ g/ml) e submetidas à quantificação de fluorescência por citometria de fluxo (FACSscan, Becton e Dickinson) e o perfil de ciclo celular foi analisado pelo software CellQuest (Becton e Dickinson). A fim de avaliar o padrão de morte, as células foram transduzidas individualmente ou com a combinação dos vírus e após 72h avaliadas com a marcação de Annexina V-Alexia 488 (Invitrogen) e contra corada com iodeto de propídeo, segundo o protocolo do fabricante. A intensidade de fluorescência de cada marcador foi obtida por citometria de fluxo, como descrito acima.

4.4 Ensaios de RT-qPCR

Após estabelecimento de MOI adequado, as células foram transduzidas individualmente ou em combinação e após 48h foi obtido o RNA pelo reagente

Trizol (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantidade total de RNA extraído foi medida pela absorbância a 260nm e a integridade foi avaliada em gel de agarose a 1%. O cDNA foi reversamente transcrito utilizando random primers e a enzima MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). A reação de RT-qPCR foi realizada utilizando-se o Master Mix (Invitrogen). As quantidades de primers e cDNA foram padronizadas através de curvas de eficiência. Os genes identificados em trabalhos anteriores foram desenhados através do programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). A tabela 1 descreve os primers utilizados.

Tabela 1. Descrição da sequência dos primers utilizados

Gene	Sequência
GAPDH	F - TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC
	R - GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG
P53	F - TCT GAC TGT ACC ACC ATC CAC TA
	R - CAA ACA CGC ACC TAC AAG C
hIFN-B	F - AAA CTC ATG AGC AGT CTG CA
	R - AGG AGA TCT TCA GTT TCG GAG G
P73	F - GCA CCA CGT TTG AGC ACC TCT
	R - GCA GAT TGA ACT GGG CCA TGA
P63	F - TCC TCA GGG AGC TGT TAT CC
	R - ATT CAC GGC TCA GCT CAT GG
P21	F - AAG ACC ATG TGG ACC TGT CAC TGT
	R - GAA GAT CAG CCG GCG TTT G
SESN2	F - CAA GCT CGG AAT TAA TGT GCC
	R - CTC ACA CCA TTA AGC ATG GAG
NOXA	F - GCT GGA AGT CGA GTG TGC TA
	R - CCT GAG CAG AAG AGT TTG GA

4.5 Ensaio Clonogênico

As linhagens de câncer colorretal foram plaqueadas em placas de 24 poços (5×10^4 por poço) e após 24h tratadas com os vetores isolados ou em combinação. Após 24h da transdução as células foram colhidas com tripsina e

contadas, e plaqueadas 500 células por poço em placas de seis poços. Após 10 dias as células foram fixadas com metanol e ácido acético e coradas com azul de tripan 20% para contagem de colônias.

4.6 Avaliação de marcadores de imunogenicidade

A imunogenicidade foi determinada pela detecção de marcadores estabelecidos para morte imunogênica, sendo eles marcação positiva para Annexina V na membrana extracelular, marcação positiva para calreticulina na membrana extracelular e liberação de ATP e HMGB1 no sobrenadante. Sendo assim, após o tratamento por 72h, as células foram recuperadas com tripsina, lavadas com PBS e avaliadas com a marcação de Annexina V-Alexia 488 (Invitrogen), conforme descrito anteriormente. A atividade de caspase 3 e 7 foi avaliada pelo reagente CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (ThermoFisher Scientific). A expressão de calreticulina foi avaliada usando o anticorpo anti-calreticulina conjugado a Alexa 488 (IC3898G R&D Systems) e contra coradas com iodeto de propídeo. A intensidade de fluorescência de cada marcador foi obtida por citometria de fluxo, no equipamento Attune (ThermoFisher Scientific).

A detecção de ATP foi realizada utilizando o kit ENLITEN ATP Assay System (Pomega, WI. EUA) seguindo a orientação do fabricante. HMGB1 foi detectado utilizando o kit HMGB1 ELISA kit (human) (Aviva Systems Biology, CA. USA) seguindo a orientação do fabricante.

4.7 Obtenção de amostras de pacientes

Esta fase do projeto está em andamento e até o momento do depósito da tese ainda não foi obtido resultados devido à complexidade da proposta. Sendo assim, serão selecionados doadores saudáveis e pacientes de câncer do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) que aceitem assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e atendam os critérios de elegibilidade. Os médicos Dra. Rachel S. P. Riechermann, oncologista clínica e chefe do núcleo de pesquisa clínica do ICESP, colaborará com a indicação de pacientes elegíveis para coleta de sangue para este projeto e o Dr. Ulysses Ribeiro, coordenador da área cirúrgica, colaborará na indicação de pacientes elegíveis para coleta de tumor. O Dr. Evandro Sobroza de Mello, coordenador do Laboratório de Anatomia Patológica nos auxiliará nas avaliações patológicas. Sendo assim, serão colhidos 30 ml de sangue periférico do qual será obtido células mononucleares para o cultivo celular. Este sangue será colhido em dois diferentes momentos: o primeiro na admissão do paciente para a internação para a cirurgia e o segundo 30 dias após a cirurgia, ou antes do início da quimioterapia. A amostra de tumor será direcionado para cultura primária e xenotransplante em animais imunodeficientes e será colhido de pacientes os quais também foram coletadas o sangue periférico. Os tumores serão obtidos durante a cirurgia, entretanto podem ser colhidos amostras de biópsias endoscópicas, tecido normal adjacente ao tumor e metástases hepáticas, caso estes apresentem melhor viabilidade celular frente à cultura primária. Sendo assim, serão colhidas amostras preferencialmente de pacientes de câncer colorretal, entretanto, devido à disponibilidade, interesse e viabilidade metodológica, pacientes de outros tipos tumorais poderão ser incluídos no estudo.

4.7.1 Critérios de inclusão:

- Idade acima de 18 anos
- Pacientes com diagnóstico de tumores do trato gastrointestinal candidatos à cirurgia oncológica
- Estádios II a IV
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido

4.7.2 Critérios de exclusão:

- Quimioterapia anterior à cirurgia
- Radioterapia anterior à cirurgia

4.7.3 Cultura primária de amostras cirúrgicas

Após a coleta do material por procedimento cirúrgico ou endoscópico, fragmentos de 5mm a 1cm serão lavados com PBS e rapidamente colocado em meio de transporte contendo meio de cultivo sem soro e com antibióticos e direcionado para o processamento no laboratório de cultivo celular. Na cabine de segurança biológica, a peça cirúrgica será lavada por 5 minutos com meio de

cultivo contendo o dobro da concentração padrão de antibióticos e antifúngicos. A seguir, a peça será mantida em meio contendo 10% SFB e fragmentada com bisturi e posteriormente serão centrifugados a 2000rpm por 2 minutos e o sobrenadante descartado. Os fragmentos serão submetidos à digestão enzimática com tripsina 10x concentrada por 5 minutos. A seguir, estes serão colocados em uma placa e o meio de cultivo será adicionado cuidadosamente de modo a não remover o contato dos fragmentos com a placa. O meio de cultivo é 50%DMEM + 50%F12 (Gibco) contendo 10% SFB, 50µg/mL de gentamicina, 25µg/mL de ampicilina e 2,5µg/mL de fungizona (anfotericina B) suplementado com EGF (20ng/ml) e FGF (20ng/ml) e 0,02% de B-27 (Gibco). A origem epitelial será confirmada por avaliações morfológicas e marcação de citoqueratina 20. Deste modo esperamos obter cultura primária de células epiteliais e estromais, tanto de tecido normal adjacente ao tumor, como de amostras tumorais.

4.7.4 Diferenciação de monócitos em células dendríticas

Esta etapa do projeto será realizada em colaboração com o Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Após a coleta de sangue periférico (30ml) com heparina (50U/ml) é separada a camada mononuclear, através de gradiente de centrifugação com Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). A camada mononuclear é ressuspensa e semeada em placas de cultura de seis poços em meio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de FCS (Gibco) e Antibiótico-Antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina; Gibco). Após

cultivo por 24 horas a 37°C, células não aderentes são removidas e as aderentes, no caso monócitos, serão direcionadas para diferenciação em células dendríticas.

A diferenciação de monócitos para células dendríticas (MO-iDC) é feita pela adição das citocinas GM-CSF (50 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e IL-4 (50 ng/ml; R&D Systems). Após sete dias, as MO-iDCs serão caracterizadas e co-cultivadas com linhagens estabelecidas ou amostras de tumor primária dos pacientes tratadas com a combinação AdRGD-PGp53 e AdRGD-PGIFN β e avaliadas quanto à expressão de moléculas co-estimulatórias.

4.7.5 Avaliação funcional de células dendríticas co-cultivadas com células tumorais tratadas com a combinação

A seguir, as células dendríticas que tiveram contato com células tumorais morrendo pela combinação dos vetores serão submetidas ao co-cultivo com linfócitos T CD3⁺ singeneicos em relação às DCs e o perfil de proliferação e ativação desses linfócitos será avaliado por citometria de fluxo para os marcadores CD4 e CD8, CD3 e Foxp3, ROR γ t, GATA-3 e T-bet.

4.8 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados em gráficos de barras. Foram utilizados testes paramétricos para verificar a significância das diferenças. Os testes utilizados estão indicados em cada figura. O nível de significância foi bilateral e $\leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Tolerância ao vetor e expressão dos transgenes.

Nossa primeira abordagem foi identificar uma maior quantidade de vírus possível de ser utilizada e que não induzisse toxicidade. Sendo estas linhagens sensíveis ao vetor, variando o MOI (multiplicidade de infecção) de 0 a 200, foi revelada a sensibilidade das células ao processo de transdução (**Figura 2**).

Figura 2. Viabilidade celular das linhagens após transdução com vetor adenoviral. Células HCT116 (p53+), HCT116p53^{-/-} (p53^{-/-}) e HT29 (p53 R273H) (5×10^3 células/poço) em placa de 96 poços e transduzidas com os MOIs indicados no gráfico (0 a 200) utilizando o vetor AdRGD-PGeGFP. A viabilidade celular medida pelo ensaio de MTT após 72h e 96h. Valores no eixo y indicam porcentagem em relação ao controle em 72h replicatas de três poços, ensaio realizado uma vez.

Sendo que a toxicidade ao vetor medida pela perda a viabilidade foi encontrada acima do MOI de 25 para as linhagens HCT116 e HCT116p53^{-/-} e para a linhagem HT29 acima de MOI de 100, testamos se estas quantidades de vírus seriam suficientes para induzir a expressão do transgene, no caso o GFP (**Figura 3**). Notório que quando feita a co-transdução de GFP com p53, os MOIs utilizados para cada vetor são a metade do quando utilizado GFP sozinho, porém a porcentagem de células GFP positivas e a intensidade da expressão aumentam consideravelmente na combinação com p53.

Figura 3. Observação de GFP como indicador da eficiência de transdução e nível de expressão. Células HCT116 (p53+), HCT116p53-/- (p53-/-) e HT29 (p53 R273H) (5e4 células por poço) foram semeadas em placas de 24 poços, após 24h as células foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP (G), AdRGD-PGp53 (P), AdRGD-PGIFN β (I). O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP; para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 100 para GFP; 50 de p53 mais 50 de GFP; 50 de IFN β mais 50 de GFP; 50 de p53 mais 50 de IFN β . Após 48h da transdução as células foram colhidas, contadas e fixadas com paraformaldeído 4%. A detecção de células positivas para GFP foi feita no citômetro de fluxo Attune. * p<0.05 One Way Anova; Pós-teste de Tukey. N=3

De maneira exploratória, verificamos que a dinâmica da expressão se altera em relação ao tempo, entretanto devido ao promotor PG, a linhagem com

p53 selvagem apresentar a maior intensidade de expressão, e quando transduzida conjuntamente com vetor para p53 há um aumento considerável de expressão em todas as linhagens. O vetor IFN β não influencia a expressão do vetor GFP (**Figura 4**).

Figura 4. Detecção de células GFP + em tempos crescentes após transdução. Células HCT116 (p53+), HCT116p53^{-/-} (p53^{-/-}) e HT29 (p53 R273H) (1e5 células) foram semeadas em placas de 6 poços, após 24h as células foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP (**G**), AdRGD-PGp53 (**P**), AdRGD-PGIFN β (**I**) ou sem nenhum vetor (**O**). O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP e 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP para as linhagens HCT116+ e HCT116^{-/-}. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 200 para GFP; 100 de p53 mais 100 de GFP; 100 de IFN β mais 100 de GFP. Após 48h e 72h as células foram recuperadas, fixadas em paraformaldeído 4% e a porcentagem e intensidade média de expressão foi obtida por citometria de fluxo no equipamento Attune.

Como a expressão do transgene é dependente de p53, decidimos confirmar a responsividade a p53 frente a um estímulo de estresse nas células HCT116 e HCT116^{p53^{-/-}}. Para isso, as células foram tratadas com doxorrubicina (1 μ M e 0.5 μ M) um potente agente indutor de estabilização e atividade de p53 (**Figura 5**). Dessa forma confirmamos a ausência de expressão de p53 nas linhagens nocautes para p53. A linhagem HT29, por sua mutação, apresenta expressão estabilizada de p53 (**Anexo. Figura 2.a**).

Figura 5. Western Blot para detecção de proteína p53. Células HCT116 e HCT116p53^{-/-} foram tratadas com doxorrubicina a 1µM e 0.5µM e após 24h extraído proteína e realizado Western Blot.

Visto que seria necessário diminuir a quantidade de vetor utilizado quando comparado com trabalhos anteriores do grupo, exploramos também se em baixas quantidades seria também possível detectar a expressão do transgene, no caso GFP. Observamos que mesmo utilizando MOIs de 1 seria possível detectar expressão, apesar de baixa e em apenas 4% das células p53+. Novamente utilizamos doxorrubicina a fim de estabilizar a proteína endógena de p53, e neste caso mesmo no MOI 1 observamos aproximadamente 7% de células p53+ GFP+. A partir do MOI 50, mais de 80% das células p53+ eram GFP+, esses valores não eram muito diferentes para células tratadas com doxorrubicina na mesma MOI, mas a intensidade de expressão subiu cerca de 10 vezes. O mesmo foi observado para as células p53^{-/-}, entretanto em uma menor intensidade (**Figuras 6**). Sendo assim, definimos como MOI de 25 para realizar os próximos ensaios nas linhagens HCT116 e HCT116p53^{-/-} e um MOI de 100 para a linhagem HT29.

Figura 6. Porcentagem e intensidade de expressão de GFP em diferentes MOIs. Células HCT116 (p53⁺) e HCT116^{p53^{-/-}} (p53^{-/-}) e HT29 foram transduzidas em diferentes MOIs (indicados no gráfico) e a expressão de GFP foi detectada por citometria de fluxo após 48h. As células também foram tratadas por 24h com doxorrubicina 1 μ M, após 24h de transdução para ativação de atividade transcricional de p53. Valores no eixo y à esquerda representam % de células GFP+ (valores representados por barras) e valores à direita representam intensidade de expressão de GFP (y median) (valores representados pela linha).

Como o status de p53 das linhagens pode interferir na expressão dos transgenes, decidimos explorar também as linhagens A549 e H1299 (positiva e negativa para p53, respectivamente), derivadas de câncer de pulmão, e as linhagens U87 e U251 (selvagem e mutada para p53, respectivamente), derivadas de glioblastoma, quanto à dinâmica de expressão do GFP. Apesar de

a porcentagem de células positivas para p53 não alterar entre os tratamentos, e nem diferir quanto ao status de p53, observamos que o status de p53 interfere na intensidade da expressão do transgene, a qual aumenta quando restaurada a expressão de p53 (**Figura 7**).

Figura 7. Capacidade de transdução e expressão de GFP em outras linhagens celulares. Linhagens de câncer de pulmão (A549 e H1299) e de glioblastoma (U87 e U251) foram semeadas em placas de 6 poços (1e5 células), após 24h as células foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP (**G**), AdRGD-PGp53 (**P**), AdRGD-PGIFN β (**I**) ou sem nenhum vetor (**O**) por 24h. O MOI total foi de 50 para GFP; 25 de p53 mais 25 de GFP e 25 de IFN β mais 25 de GFP. Após 72h as células foram recuperadas, fixadas em paraformaldeído 4% e a porcentagem e intensidade média de expressão foi obtida por citometria de fluxo no equipamento Attune. N=2.

Por fim, validamos a expressão de p53 e IFN β . Detemos via western blot o aumento de p53 tanto nos tratamentos isolados quanto na combinação em todas as linhagens. Observamos também um aumento de IFN β , detectado por ELISA, o qual tende a ser maior na combinação quando comparado com o tratamento isolado para as linhagens HCT116p53^{-/-} e HT29, entretanto na linhagem HCT116 não há diferença entre o vetor isolado ou em combinação com p53 (**Figura 8**).

Figura 8. Validação da expressão dos transgenes de interesse. A. Expressão de p53. Células HCT116 p53+, HCT116p53-/- e HT29 (2e5 células) foram semeadas em placas de 6 poços, e após 48h de transdução foi extraída a proteína e analisado via western blot. **B.** As células foram semeadas em placas de 12 poços (1e5 células) e o sobrenadante coletado após 72h da transdução. A expressão de IFNβ foi avaliada usando o kit VeriKine human IFN beta ELISA (PBL Assay Science) segundo protocolo do fabricante. AdRGD-PGeGFP (**G**), AdRGD-PGp53 (**P**), AdRGD-PGIFNβ (**I**) em combinação p53 + IFNβ (**C**) ou sem vetor (**O**). Os MOIs totais foram de 25 para as linhagens HCT116 e HCT116 p53-/- e de 100 para a linhagem HT29. *p<0.05 One Way Anova; Pós-teste de Tukey. N=3.

5.2 Proliferação e viabilidade frente à combinação de vetores

Inicialmente exploramos alguns conjuntos de linhagens quanto à proliferação e viabilidade frente aos tratamentos isolados e na combinação p53 e IFNβ. Em todas as linhagens a combinação mostrou uma marcada redução após 72h. Como cada linhagem terá um padrão de redução aparentemente relacionado ao status de p53 (**Figura 8**), continuamos focando nas linhagens colorretais (**Figura 9**).

Figura 9. Impacto do tratamento adenoviral em um painel de linhagens celulares. As linhagens descritas no gráfico foram semeadas em placas de 6 poços (1e5 células), após 24h as células foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP, AdRGD-PGp53, AdRGD-PGIFNβ por 24h. O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFNβ mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFNβ para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 200 para GFP; 100 de p53 mais 100 de GFP; 100 de IFNβ mais 100 de GFP; 100 de p53 mais 100 de IFNβ. Para as linhagens A549, H1299, U87 e U251 o MOI total foi de 200 para GFP; 100 de p53 mais 100 de GFP; 100 de IFNβ mais 100 de GFP; 100 de p53 mais 100 de IFNβ. Após 72 horas as células foram recuperadas e contadas em câmara de Neubauer com exclusão de células marcadas com azul de tripan (0.1%). Os valores mostrados representam a porcentagem relativa ao controle (GFP = 100%). N=2

Figura 10. Contagem de células após 72 horas de tratamento. Células HCT116 (p53+), HCT116p53-/- (p53-/-) e HT29 (p53 R273H) foram plaqueadas em placa foram semeadas em placas de 24 poços (5e4 células), após 24h as células foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGLuc (L), AdRGD-PGp53 (P), AdRGD-PGIFNβ (I) ou a combinação de p53 e IFNβ (C) por 24h. O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFNβ mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFNβ para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 100 para GFP; 50 de p53 mais 50 de GFP; 50 de IFNβ mais 50 de GFP; 50 de p53 mais 50 de IFNβ. Após 72 horas as células foram recuperadas e contadas em câmara de Neubauer com exclusão de células marcadas com azul de tripan (0.1%). * p<0.05 One Way Anova; Pós-teste de Tukey. N=4

Figura 11. Ensaio de viabilidade celular por MTT após 96h. Células HCT116 (p53+), HCT116p53^{-/-} (p53^{-/-}) e HT29 (p53 R273H) foram plaqueadas em placa de 96 poços (5e3 células/poço) e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP (**G**), AdRGD-PGp53 (**P**), AdRGD-PGIFN β (**I**) ou em combinação (**C**). Os MOIs totais foram de 25 para as linhagens HCT116 e HCT116 p53^{-/-} e de 100 para a linhagem HT29. 96h após a transdução foram obtidos os valores de absorbância pelo teste de MTT, e os valores foram normalizados pelo controle GFP. * $p < 0.05$ One Way Anova; Pós-teste de Tukey. N=3

Avaliando a viabilidade celular, observamos que todos os tratamentos induzem uma perda da viabilidade, sendo maior quando com p53 ou em combinação com IFN β , entretanto sendo esta perda não maior que 40% após 96h (**Figura 10**). Por outro lado, verificando a alteração do número de células após 72h de tratamento (**figura 9**) observamos que na linhagem HCT116 p53+ a combinação dos genes p53 e IFN β leva a uma maior redução do número de células quando comparado com o vetor controle e com IFN β sozinho, entretanto, apesar de não ser estatisticamente significativo, a célula tratada com o vetor para p53 apresenta redução de cerca de 30%, com IFN β cerca de 15%, contra 65% para a combinação quando comparados com o vetor controle.

A linhagem HCT116 p53^{-/-} mostrou uma redução significativa no número de células quando tratada com os vetores isoladamente ou em combinação, entretanto não houve diferença entre os tratamentos isolados e a combinação, com redução variando entre 45% e 55% quando comparados com os controles.

Para a linhagem mutante para p53, HT29, tanto a combinação dos genes, quanto o tratamento com IFN β leva a uma maior redução do número de células

quando comparado com o vetor controle. Além disso, a combinação também é menor do que o tratamento com p53, entretanto IFN β e a combinação não apresentam diferenças entre si, apesar de apresentarem, respectivamente, 53% e 61% de redução quando comparados com o vetor controle.

5.3 Ensaio Clonogênico

Ao avaliar a capacidade de formação de colônias (**Figura 11**), observamos que na linhagem HCT116 p53+ todos os tratamentos induzem uma significativa redução do número de colônias, sendo a combinação mais eficiente em reduzir o número de colônias quando comparado com os outros tratamentos. Entretanto, apesar das linhagens HCT116 p53-/- e HT29 apresentarem uma marcante redução no número de colônias quando tratadas, não houve diferença entre os tratamentos isolados e a combinação.

Figura 12. Ensaio clonogênico. Células HCT116 (p53+), HCT116p53-/- e HT29 (p53 R273H) foram semeadas em placas de 24 poços (5e4 células), após 24h as células foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP (G), AdRGD-PGp53 (P), AdRGD-PGIFN β (I) ou a combinação de p53 e IFN β (C) por 24h. O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFN β para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 100 para GFP; 50 de p53 mais 50 de GFP; 50 de IFN β mais 50 de GFP; 50 de p53 mais 50 de IFN β . Após 24h da transdução as células foram colhidas com tripsina e contadas, e plaqueadas 500 células por poço em placas de 6 poços. Após 10 dias as células foram fixadas com metanol e ácido acético e coradas com azul de tripan 20% para contagem de colônias. * p<0.05 One Way Anova; Pós-teste de Tukey. N=3.

Como outra forma de avaliar se as células mantinham a viabilidade após o tratamento, as linhagens de câncer colorretal foram semeadas em diferentes quantidades em placas de 96 poços e mantidas por 10 dias. Após esse período, foi avaliada a viabilidade por MTT. Novamente as linhagens tratadas com a combinação p53 e IFN β mostrou uma reduzida viabilidade após 10 dias (**Figura 12**).

Figura 13. Viabilidade após 10 dias. As linhagens foram tratadas conforme descrito na figura 13. Após 24h de transdução as células foram recuperadas e semeadas em placa de 96 poços nas quantidades de 31, 15 e 7 para as linhagens HCT116+ e HCT116 p53 -/-, e 625, 313 e 156 para a linhagem HT29 (valores indicados no eixo x do gráfico = quantidade de células semeadas por poço). Após 10 dias foi adicionado o reagente de MTT, e após solubilização dos cristais a absorbância foi medida. Os valores mostrados representam a porcentagem relativa ao controle (GFP n31 ou n1250 = 100%).

5.4 Ciclo e morte celular

A seguir avaliamos as alterações no ciclo celular nas três linhagens e para todas elas a combinação p53/IFN β induz um maior aumento na população hipodiplóide. Há um aumento das populações hipodiplóides também relacionado com o tempo de transdução, os quais atingem, no tratamento combinado,

aproximadamente 45% na linhagem HCT116+, 65% na HCT116 p53-/- e 60% na HT29 quando avaliados em 72 horas (**Figura 13.A**). Quanto ao ciclo celular propriamente dito, em 48h é possível observar um aumento da população nas fases S e G2/M para a linhagem HCT116 no tratamento com p53; já esta mesma parada de ciclo pode ser observada em no tratamento tanto com p53 quando na combinação para as outras linhagens (**Figura 13.B**).

Figura 14. Avaliação de células sub G1 e ciclo celular. As linhagens forma foram semeadas em placas de 6 poços (1e5 células), após 24h as células foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP, AdRGD-PGp53, AdRGD-PGIFN β por 24h. O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFN β para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 200 para GFP; 100 de p53 mais 100 de GFP; 100 de IFN β mais 100 de GFP; 100 de p53 mais 100 de IFN β . Após 48h e 72h as células foram recuperadas, fixadas em etanol 70% e marcadas com iodeto de propídeo. **A.** Células hipodiplóides. **B.** Representação de células nas fases do ciclo celular. A quantidade de marcação foi avaliada no citômetro de fluxo Attune. 48h n=5 e 72h n=3.

5.5 Mecanismos de Morte Celular

Após 72h de tratamento, avaliamos a porcentagem de células positivas para Annexina V (**Figura 14**), que indica células cuja membrana expõe fosfatidilserina para o meio extracelular, um indicativo de apoptose. Tanto na linhagem HCT116 p53+ quanto na p53-/- observamos que o tratamento isolado com p53 e a combinação deste com IFN β levou a um aumento de células positivas para marcação com Annexina V. Já na linhagem HT29 a combinação levou a um maior aumento quando comparado com o vetor controle e com p53, enquanto não mostrou diferença contra o tratamento com IFN β , apesar de todos os tratamentos levarem a um aumento quando comparados com o controle.

Figura 15. Células positivas para Annexina V. As células foram semeadas em placas de 24 poços (5e4 células), após 24h as células foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGLuc (L), AdRGD-PGp53 (P), AdRGD-PGIFN β (I) ou a combinação de p53 e IFN β (C) por 24h. O MOI total foi de 25 para LUC; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFN β para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 100 para GFP; 50 de p53 mais 50 de GFP; 50 de IFN β mais 50 de GFP; 50 de p53 mais 50 de IFN β . Após 72h da transdução o sobrenadante e as células foram colhidas, contadas e 1e5 células por condição foram incubadas com Annexina V e iodeto de propídeo. A detecção de células positivas para Annexina V foi feita no citômetro de fluxo Attune. * p<0.05 One Way Anova; Pós-teste de Tukey. N=3.

Também avaliamos a porcentagem de células com caspase 3 e 7 ativadas (**Figura 15**) através do reagente CellEvent, que consiste em um conjugado de 4 aminoácidos (DEVD) com um corante de ligação a ácidos nucleicos. O peptídeo

DEVD é alvo de caspase 3 e 7, que quando o cliva, libera o corante, e este quando ligado ao DNA produz fluorescência que é captada por citometria de fluxo.

Assim, observamos que já em 48h temos um maior aumento da atividade de caspase tanto nas linhagens p53+ e p53-/-, sendo nesta última também possível de observar um aumento da atividade de caspase quando tratado com p53. Na linhagem HT29, em 72h observamos um maior aumento da combinação, quando comparado com os outros tratamentos, mas o IFN β também foi capaz de levar a um aumento da atividade de caspase 3 e 7, apesar de menor do que na combinação.

Figura 16. Células positivas para atividade de caspase 3 e 7. As células foram semeadas em placas de 24 poços (5e4 células), após 24h contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGLuc (L), AdRGD-PGp53 (P), AdRGD-PGIFN β (I) ou a combinação de p53 e IFN β (C) por 24h. O MOI total foi de 25 para LUC; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFN β para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 100 para GFP; 50 de p53 mais 50 de GFP; 50 de IFN β mais 50 de GFP; 50 de p53 mais 50 de IFN β . Após 48 ou 72h da transdução o sobrenadante e as células foram colhidas, contadas e 1e5 células por condição foram incubadas com o reagente CellEvent por 30 minutos. A detecção de células positivas para a marcação foi feita no citômetro de fluxo Attune. * p<0.05 One Way Anova; Pós-teste de Tukey. N=3.

Avaliamos também um importante marcador de morte imunogênica, que é a exposição de calreticulina na membrana das células (**Figura 16**). O

tratamento combinado na linhagem p53 + levou a um aumento de calreticulina quando comparado com o controle e com IFN β , entretanto não mostrou diferença quando comparado com p53. Para a linhagem p53 -/-, o tratamento combinado mostrou um aumento quando comparado com os tratamentos isolados, e o tratamento com p53 um aumento quando comparado com o controle. Na linhagem HT29 houve aumento apenas no tratamento combinado. Avaliamos também a liberação de ATP para o meio extracelular (**Figura 17**), e observamos que nas linhagens HCT116 e HCT116 p53-/- o vetor em si já é capaz de induzir a liberação de ATP, enquanto na linhagem HT29 as condições IFN β e combinação levaram a um aumento de ATP no sobrenadante. Já HMGB1, um outro marcador de morte imunogênica, não apresentou diferenças no sobrenadante em qualquer condição (**Figura 18**).

Figura 17. Células positivas para Calreticulina (CRT+). As células foram semeadas em placas de 24 poços (5e4 células), após 24h contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGLuc (L), AdRGD-PGp53 (P), AdRGD-PGIFN β (I) ou a combinação de p53 e IFN β (C) por 24h. O MOI total foi de 25 para LUC; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFN β para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 100 para GFP; 50 de p53 mais 50 de GFP; 50 de IFN β mais 50 de GFP; 50 de p53 mais 50 de IFN β . Após 72h da transdução o sobrenadante e as células foram colhidas, contadas e 1e5 células por condição foram incubadas com anticorpo anti-calreticulina e iodeto de propídeo. A detecção de células positivas para a calreticulina foi feita no citômetro de fluxo Attune. * p<0.05 One Way Anova; Pós-teste de Tukey. N=3

Figura 18. Liberação de ATP no sobrenadante. As células foram semeadas em placas de 12 poços (1e5 células) e transduzidas com os vetores AdRGD-PGLuc (L), AdRGD-PGp53 (P), AdRGD-PGIFN β (I) ou a combinação de p53 e IFN β (C) por 24h ou sem nenhum vetor (O). O MOI total foi de 25 para LUC; 12.5 de p53 mais 12.5 de LUC; 12.5 de IFN β mais 12.5 de LUC; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFN β para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 100 para GFP; 50 de p53 mais 50 de GFP; 50 de IFN β mais 50 de LUC; 50 de p53 mais 50 de IFN β . Após 72h da transdução o sobrenadante foi recuperado e a quantificada o ATP conforme instruções do fabricante. * $p < 0.05$ One Way Anova; Pós-teste de Tukey. N=3

Figura 19. Liberação de HMGB1 no sobrenadante. As células foram semeadas em placas de 12 poços (1e5 células), e transduzidas com os vetores AdRGD-PGLuc (L), AdRGD-PGp53 (P), AdRGD-PGIFN β (I) ou a combinação de p53 e IFN β (C) por 24h ou sem nenhum vetor (O). O MOI total foi de 25 para LUC; 12.5 de p53 mais 12.5 de LUC; 12.5 de IFN β mais 12.5 de LUC; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFN β para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Para a linhagem HT29 o MOI total foi de 100 para GFP; 50 de p53 mais 50 de GFP; 50 de IFN β mais 50 de LUC; 50 de p53 mais 50 de IFN β . Após 72h da transdução o sobrenadante foi recuperado e o HMGB1 quantificado com kit para ELISA conforme fabricante.

5.6 Ação transcricional e expressão de genes alvo

Avaliamos também a expressão de mRNA de alguns possíveis genes alvos da terapia. Na linhagem HCT116 p53+ (**Figura 19**) o tratamento isolado com p53 levou a um aumento de p53 e p21; o tratamento com IFN β levou a um aumento de IFN β ; e o tratamento combinado levou a um aumento de p53, IFN β , p73, p63 e NOXA e a redução na expressão de Sestrin. Na linhagem HCT116 p53-/- (**Figura 20**) o tratamento isolado com p53 levou a um aumento de p53 e

p21 e a uma redução na expressão de Sestrin; o tratamento com IFN β levou a um aumento de IFN β , p73, p63 e NOXA; e o tratamento combinado levou a um aumento de p53, IFN β , p73, p63, p21 e NOXA. Na linhagem HT29 (**Figura 21**) o tratamento isolado com p53 levou a um aumento de p53; o tratamento com IFN β levou a um aumento de IFN β e NOXA; e o tratamento combinado levou a um aumento de p53, IFN β , p73, p21, Sestrin e NOXA, entretanto reduziu a expressão de p63.

Figura 20. Expressão de genes na linhagem HCT116 p53+ (H+). As células foram semeadas em placas de 6 poços (5e5 células), após 24h foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP (G), AdRGD-PGp53 (P), AdRGD-PGIFNβ (I) ou sem vetor (O). O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFNβ mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFNβ mais 12.5 de p53 (C). Após 48h da transdução foi extraído o RNA. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi usado para a quantificação da expressão gênica (fold change). O gene GAPDH foi usado como normalizador. N=3

Figura 21. Expressão de genes na linhagem HCT116 p53^{-/-} (H-). As células foram semeadas em placas de 6 poços (5e5 células), após 24h foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP (**G**), AdRGD-PGp53, (**P**), AdRGD-PGIFN β (**I**) ou sem vetor (**O**). O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP, 12.5 de IFN β mais 12.5 de p53 (**C**). Após 48h da transdução foi extraído o RNA. O método 2- $\Delta\Delta C_t$ foi usado para a quantificação da expressão gênica (fold change). O gene GAPDH foi usado como normalizador. N=3

Figura 22. Expressão de genes na linhagem HT29. As células foram semeadas em placas de 6 poços (5e5 células), após 24h foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP (G), AdRGD-PGp53, (P), AdRGD-PGIFN β (I) ou sem vetor (O). O MOI total foi de 100 para GFP; 50 de p53 mais 50 de GFP; 50 de IFN β mais 50 de GFP; 50 de IFN β mais 50 de p53 (C). Após 48h da transdução foi extraído o RNA. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi usado para a quantificação da expressão gênica (fold change). O gene GAPDH foi usado como normalizador. N=3

5.7 Combinação com Quimioterápicos

Decidimos investigar se esses vetores aumentariam a sensibilidade das linhagens frente a alguns quimioterápicos. Assim, após 24 horas de transdução tratamos com doxorrubicina, 5-fluorouracil, cisplatina e Nutlin-3. Observamos um benefício dos vetores isolados mesmo nas doses menores dos quimioterápicos, sendo que a combinação dos vetores para p53 e IFN β pode aumentar a sensibilidade das linhagens de câncer colorretal para quimioterápicos (**Figuras 22, 23 e 24**).

Figura 23. Resposta das células HCT116 ao tratamento associado de transferência gênica e quimioterápicos. Células da linhagem HCT116 foram plaqueadas (5e3 células/poço) e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP, AdRGD-PGp53, AdRGD-PGIFN β por 24h. O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFN β ; Os quimioterápicos utilizados foram a doxorrubicina (D), 5-fluorouracil (5-FU) cisplatina (Cis) e Nutlin-3 (Nutlin) nas respectivas doses indicadas no gráfico e após 72h de quimioterápicos (96h após a transdução), foram obtidos os valores de absorbância do teste de MTT, e os valores foram normalizados pelo controle GFP + DMSO. N=4. + (C $\neq$ G); # (C $\neq$ P); \$ (C $\neq$ I); p<0.05 Two Way ANOVA, Bonferroni pós teste.

Figura 24. Resposta das células HCT116p53^{-/-} ao tratamento associado de transferência gênica e quimioterápicos. Células da linhagem HCT116p53^{-/-} foram plaqueadas (5e3 células/poço) e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP, AdRGD-PGp53, AdRGD-PGIFNβ por 24h. O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFNβ mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFNβ; Os quimioterápicos utilizados foram a doxorubicina (D), 5-fluorouracil (5-FU) cisplatina (Cis) e Nutlin-3 (Nutlin) nas respectivas doses indicadas no gráfico e após 72h de quimioterápicos (96h após a transdução), foram obtidos os valores de absorbância do teste de MTT, e os valores foram normalizados pelo controle GFP + DMSO. N=4. + (C ≠ G); # (C ≠ P); \$ (C ≠ I); p<0.05 Two Way ANOVA, Bonferroni pós teste.

Figura 25. Resposta das células HT29 ao tratamento associado de transferência gênica e quimioterápicos. Células da linhagem HT29 foram plaqueadas (5e3 células/poço) e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP, AdRGD-PGp53, AdRGD-PGIFNβ por 24h. O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFNβ mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFNβ; Os quimioterápicos utilizados foram a doxorubicina (D) cisplatina (Cis) e 5-fluorouracil (5-FU) nas respectivas doses indicadas no gráfico e após 72h de quimioterápicos (96h após a transdução), foram obtidos os valores de absorbância do teste de MTT, e os valores foram normalizados pelo controle GFP + DMSO. N=4. + (C ≠ G); # (C ≠ P); \$ (C ≠ I); p<0.05 Two Way ANOVA, Bonferroni pós teste.

Avaliamos também se a adição dos quimioterápicos doxorrubicina e 5-fluorouracil podem induzir alterações no ciclo celular. Foram escolhidas as concentrações de 0.625uM e 25uM respectivamente, e avaliadas nas linhagens HCT116+ e HCT116 p53-/- (**Figura 25**). O aumento da população hipodiplóide, apesar de discreto, foi maior com o quimioterápico 5-fluorouracil com o tratamento combinado com os vetores para p53 e IFN β . Entretanto, a doxorrubicina promoveu um aumento na população em G2/M para a linhagem positiva para p53, e aumento da população G1 na linhagem negativa. Já o 5-fluorouracil promoveu um aumento em S nas duas linhagens, entretanto esse aumento se perde linhagem HCT116+ quando tratado com os vetores para p53, IFN β e combinação.

Figura 26. Ciclo celular na associação da terapia gênica com quimioterápicos. As células foram semeadas em placas de 6 poços (1e5 células) e após 24h foram contadas e transduzidas com os vetores AdRGD-PGeGFP, AdRGD-PGp53, AdRGD-PGIFN β por 24h. O MOI total foi de 25 para GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de GFP; 12.5 de IFN β mais 12.5 de GFP; 12.5 de p53 mais 12.5 de IFN β para as linhagens HCT116+ e HCT116 -/-. Após 24 horas de transdução foram adicionados os quimioterápicos doxorrubicina e 5-fluorouracil, nas concentrações de 0.625uM e 25uM respectivamente. Após 48h a transdução, as células foram recuperadas, fixadas em etanol 70% e marcadas com iodeto de propídeo. A quantidade de marcação foi avaliada no citômetro de fluxo Attune.

6. Discussão

Inicialmente foi necessário superar o fato de que os vetores controles, tanto GFP quanto luciferase, induziam morte celular, o que inviabilizava a comparação com os vetores de tratamento. Investigando este ponto, observamos que não houve contaminação dos estoques de AdRGD-PGeGFP com outro vetor e que a sensibilidade foi proporcional à MOI utilizada, então o problema se resolve utilizando a MOI de 25. Apesar disso, essas linhagens são eficientemente transduzidas mesmo em quantidades bem menores das habitualmente utilizadas em nosso laboratório para outras linhagens tanto humanas quanto murinas. Sendo assim identificamos uma maior dose viral em que não é observada uma redução importante da viabilidade. Testamos também outra linhagem de câncer colorretal, HT29, que apresenta mutação em p53 (R273H), e mesmo esta linhagem apresentou certa toxicidade dependente de dose para o vetor para GFP, apesar de ser mais resistente ao vetor.

Uma observação interessante é que foi possível detectar a indução de expressão de GFP na linhagem nocaute para p53. Esperávamos certo vazamento da expressão devido a outros elementos da região promotora do PG, entretanto não esperávamos que esse vazamento fosse também responsivo a algum sinal de estresse celular, como o tratamento com doxorrubicina. Como esse dado poderia ser resultado de um cruzamento entre as linhagens, investigamos se de fato havia expressão de p53 endógeno induzido por estresse, mas apenas a linhagem com p53 selvagem foi positiva para esta proteína. É possível que outros componentes da família do p53, como p63 ou p73, possam ter também uma ação transcricional similar, levando a ativação de elementos

responsivos a p53, apesar de que variações na sequência de aminoácidos possam levar a diferentes níveis de transativação(67). Sendo assim esse sistema pode se tornar promissor para avaliar a dependência do status de p53 na eficácia da terapia gênica proposta, e trazer suposições de como outros elementos desta família podem interagir com o promotor PG.

Como os resultados de viabilidade com as linhagens derivadas de carcinoma colorretal poderiam sugerir que este não seria o melhor modelo para testar a estratégia terapêutica, decidimos investir paralelamente em outros modelos como câncer de pulmão, representado pelas linhagens A549 e H1299 (positiva e negativa para p53, respectivamente) e glioblastoma, representado pelas linhagens U87 e U257 (selvagem e mutada para p53, respectivamente). Essas linhagens também apresentaram toxicidade ao vetor, embora tolerem uma quantidade maior. Usando o vetor para GFP como sensor da transferência gênica, todas apresentaram uma alta eficiência de transdução. E como a expressão do vetor também é dependente do status de p53, a intensidade da expressão seguiu o padrão esperado, com baixa expressão nas linhagens, quando tratadas apenas com GFP, mas expressão de GFP muito maior quando combinado com p53. Todas essas linhagens mostraram uma redução importante do número de células após o tratamento com os vetores, entretanto ainda é difícil de saber se a redução observada na combinação é dependente exclusivamente da ação de p53.

Voltando ao modelo colorretal, apesar não observar uma importante redução da viabilidade, houve importantes alterações no ciclo celular, número de células, número de colônias e viabilidade após 10 dias. Uma possível explicação

para essa diferença pode estar no modo de transdução. Para os primeiros ensaios de viabilidade, a fim de ter um controle mais preciso da transdução e do número de células semeadas, a transdução era feita em com as células ainda em suspensão. Já nos ensaios de ciclo, contagem e viabilidade após 10 dias, as células foram transduzidas 24 horas após aderirem à placa, além do fato de se trabalhar com proporções de partícula viral por volume de meio de cultura por número de células muito diferentes.

Na questão da viabilidade celular e redução do número de células é marcante o papel da combinação nas linhagens HCT116 p53+ e HT29 (p53 mutado) como também foi demonstrado pela marcante redução na capacidade de formação de colônias. Entretanto na linhagem p53-/- os dois vetores se mostraram eficientes e reduzir a viabilidade celular, observado tanto pela redução do número de células quanto pela redução no número de colônias. Talvez a diferença entre p53 e a combinação (no caso da linhagem p53+) ou IFN β e combinação (no caso da HT29) não sejam tão marcantes devido a algum desvio ainda muito alto. Entretanto, quando se observa a porcentagem do número de células na linhagem p53+ há uma sugestão de efeito sinérgico pois, a soma das porcentagens de redução dos vetores isolados (p53 – 30%; IFN β – 15%) é maior que a redução do tratamento combinado (65%). Além disso, o ensaio clonogênico também confirma uma maior redução da capacidade de formação de colônias para a combinação na linhagem p53+. Isso pode indicar que talvez o status de p53 na linhagem seja um fator que contribua para a dinâmica da expressão dos transgenes, que também são regulados por um promotor responsivo a p53. Entretanto não parece ser um fator limitante, visto

que houve marcante redução na capacidade de formação de colônia em todos os tratamentos, e principalmente na combinação.

Quanto ao tipo de morte, tanto a marcação positiva para Annexina V (que é um indicativo de exposição extracelular de fosfatidil serina na membrana) quanto para atividade das caspases 3 e 7, apontam para apoptose, entretanto somente nos casos da terapia combinada e do p53 na linhagem p53+. É bem descrito na literatura o potencial de indução de apoptose pelo restauro da expressão de p53. Chama a atenção que restaurar a expressão de p53 na linhagem p53^{-/-} leva a uma maior atividade de caspase, o que não é observado na linhagem p53⁺. Já na linhagem HT29 (p53 mutada), é interessante observar que os transgenes possuem comportamentos diferentes, talvez o inverso do que ocorre na linhagem p53 selvagem, visto que o p53 mutante não compete com as ações do p53. Interessante observar que o comportamento do IFN β também muda, parecendo ser ele o principal responsável dos efeitos observados na terapia combinada.

Morte imunogênica é definida como uma morte celular regulada capaz de induzir uma resposta imune adaptativa em um hospedeiro imunocompetente. A nível molecular, ela pode ser caracterizada pela liberação de DAMPS (*danger associated molecular pattern* – padrão molecular associado ao perigo) pelas células em processo de morte. Entre os DAMPS seis já foram reconhecidos como mecanisticamente associados à morte imunogênica, sendo eles exposição de calreticulina na membrana, liberação de interferon do tipo 1, ATP, HMGB1, ácidos nucleicos derivados de células tumorais e annexina A1(68). Um importante avanço foi observar o aumento da exposição de calreticulina pelo

tratamento combinado em todas as linhagens e a presença de ATP no sobrenadante. Entretanto, não detectamos a presença de HMGB1 no sobrenadante da cultura. Isso já foi observado em outros trabalhos que avaliaram potenciais imunogênicos em linhagens buscando marcadores em sobrenadantes de cultura, apesar de algumas linhagens não liberarem HMGB1, isso não foi fator inibitório para ativação de células dendríticas e geração de linfócitos citotóxicos (69). Esse dado reforça a necessidade de se investigar de modo funcional a capacidade imunogênica que a combinação dos vetores pode proporcionar. Sendo assim, é extremamente relevante avaliarmos o comportamento das células dendríticas e linfócitos frente à terapia.

Observando os genes modulados, as linhagens HCT116 e HCT116p53^{-/-} apresentam um comportamento semelhante, provavelmente por possuírem o mesmo *background* genético. Apesar disso possuem algumas particularidades, como a expressão de p21 ser maior apenas com o p53 na linhagem p53⁺, já na linhagem p53^{-/-} houve aumento tanto em p53 como na combinação com IFN β . P21 atua como supressora tumoral e é responsiva a ação transcricional de p53, inibindo a progressão do ciclo para a fase S. Outro ponto de diferença entre as linhagens é a baixa expressão de Sestrin apenas na combinação na linhagem p53⁺, enquanto há uma redução marcante apenas no tratamento com p53 na linhagem p53^{-/-}. Sestrin também é induzida por p53 e tem um papel na resposta celular a danos no DNA por estresse oxidativo, tendo uma potente ação na defesa antioxidante.

Sendo a expressão do transgene dependente da ação transcricional de p53, não necessariamente esta proteína estaria ativa a fim de induzir os efeitos

desejados. Por isso, decidimos então avaliar como os vetores se comportariam frente a diferentes quimioterápicos em diversas doses. Observamos que a combinação de vetores p53 e IFN β pode levar a um aumento na sensibilidade dessas linhagens, mesmo a doses mais baixas de quimioterápicos. Os efeitos mais marcantes foram observados nas linhagens HCT116 e HCT116p53-/- transduzidas com p53, e para os quimioterápicos doxorrubicina e 5-fluorouracil, sendo este último utilizado como primeira linha de tratamento para carcinoma colorretal. Isso se aproxima de uma condição clínica, sendo que pacientes submetidos à terapia gênica também se utilizem da terapia padrão. Entretanto, para a linhagem HT29, a combinação p53/interferon-beta mostrou um importante efeito antitumoral, mesmo na presença da doxorrubicina. Apesar de a doxorrubicina ser conhecida por ser um importante indutor de morte imunogênica, 5-FU não é descrito como um indutor de imunogenicidade, apesar de ser associado com outras drogas como oxaliplatina ou imunoterápicos como inibidores de checkpoint a fim de induzir ativação do sistema imune (64). Sendo assim, um aspecto interessante, porém fora do escopo deste trabalho seria avaliar alterações na imunogenicidade frente à combinação dos vetores com os quimioterápicos.

7. Conclusão

Desta forma concluímos que as vias de p53 e interferon beta são possíveis alvos para a terapia gênica do câncer colorretal. Essas vias em conjunto possuem um importante efeito indutor de morte celular, com possível ação imunomoduladora. Ainda esta terapia pode trazer benefícios para terapias já convencionais para o câncer colorretal.

9. Referências

1. Cavalli F. An appeal to world leaders: stop cancer now. *Lancet*. 2013 Feb;381(9865):425-6. PubMed PMID: 23388078. eng.
2. Stop cancer now! *Lancet*. 2013 Feb;381(9865):426-7. PubMed PMID: 23388079. eng.
3. World Health Organization. Cancer. 2018 [Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>].
4. Collaborators GRF. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct;388(10053):1659-724. PubMed PMID: 27733284. PMCID: PMC5388856. eng.
5. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2016 09;4(9):e609-16. PubMed PMID: 27470177. Epub 2016/07/25. eng.
6. World Cancer Report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.
7. Global Initiative for Cancer Registry Development (GICR) 2018 [Available from: <http://gicr.iarc.fr/en/>].
8. Grady D. *Companies Rush to Develop 'Utterly Transformative' Gene Therapies*. The New York Times. 2017.
9. Baima C. FDA aprova primeira terapia genética contra o câncer nos EUA. *O Globo*. 2017.
10. The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site 2013 [Available from: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>].
11. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide 2018 [Available from: <http://www.abedia.com/wiley/index.html>].
12. Roy-Chowdhury J, Horwitz MS. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. *Mol Ther*. 2002 Apr;5(4):340-4. PubMed PMID: 11945059. eng.
13. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*. 2000 Nov;81(Pt 11):2573-604. PubMed PMID: 11038369. eng.
14. Warnock JN, Daigre C, Al-Rubeai M. Introduction to viral vectors. *Methods Mol Biol*. 2011;737:1-25. PubMed PMID: 21590391. eng.
15. Kaufmann JK, Nettelbeck DM. Virus chimeras for gene therapy, vaccination, and oncolysis: adenoviruses and beyond. *Trends Mol Med*. 2012 Jul;18(7):365-76. PubMed PMID: 22633438. eng.
16. Ahmed AU, Tyler MA, Thaci B, Alexiades NG, Han Y, Ulasov IV, et al. A comparative study of neural and mesenchymal stem cell-based carriers for oncolytic adenovirus in a model of malignant glioma. *Mol Pharm*. 2011 Oct;8(5):1559-72. PubMed PMID: 21718006. PMCID: PMC3185211. eng.
17. Warram JM, Sorace AG, Saini R, Borovjagin AV, Hoyt K, Zinn KR. Systemic delivery of a breast cancer-detecting adenovirus using targeted microbubbles. *Cancer Gene Ther*. 2012 Aug;19(8):545-52. PubMed PMID: 22653385. PMCID: PMC3417243. eng.
18. Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA, et al. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther*. 2001 May;8(9):730-5. PubMed PMID: 11406768. eng.
19. Hunger A. Transferência gênica de p19Arf e Interferon-B em células de melanoma [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: USP; 2011.
20. Horwood NJ, Smith C, Andreakos E, Quattrocchi E, Brennan FM, Feldmann M, et al. High-efficiency gene transfer into nontransformed cells: utility for studying gene regulation and analysis of potential therapeutic targets. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S215-25. PubMed PMID: 12110141. PMCID: PMC3240136. eng.

21. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. 1991 Jun;252(5013):1708-11. PubMed PMID: 2047879. eng.
22. Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science*. 1992 May;256(5058):827-30. PubMed PMID: 1589764. eng.
23. Strauss BE, Bajgelman MC, Costanzi-Strauss E. A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition. *Cancer Gene Ther*. 2005 Dec;12(12):935-46. PubMed PMID: 15905860. eng.
24. Strauss BE, Costanzi-Strauss E. pCLPG: a p53-driven retroviral system. *Virology*. 2004 Apr;321(2):165-72. PubMed PMID: 15051377. eng.
25. Bajgelman MC, Strauss BE. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. *Virology*. 2008 Feb;371(1):8-13. PubMed PMID: 18076963. eng.
26. Gadi N, Foley SE, Nowey M, Plopper GE. p53 as Batman: Using a Movie Plot to Understand Control of the Cell Cycle. *Sci Signal*. 2013;6(271):tr2. PubMed PMID: 23592841. eng.
27. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Apr;8(4):275-83. PubMed PMID: 17380161. eng.
28. Yee KS, Vousden KH. Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis*. 2005 Aug;26(8):1317-22. PubMed PMID: 15888490. eng.
29. Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):714-23. PubMed PMID: 19730431. eng.
30. Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer*. 2010 Nov;127(10):2239-47. PubMed PMID: 20549699. eng.
31. Merkel CA, da Silva Soares RB, de Carvalho AC, Zanatta DB, Bajgelman MC, Fratini P, et al. Activation of endogenous p53 by combined p19Arf gene transfer and nutlin-3 drug treatment modalities in the murine cell lines B16 and C6. *BMC Cancer*. 2010;10:316. PubMed PMID: 20569441. PMCID: PMC2906481. eng.
32. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2018 Feb;18(2):89-102. PubMed PMID: 29242642. Epub 2017/12/15. eng.
33. O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, Choi S, Nicholas C, Shen A, et al. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell*. 2004 Dec;6(6):611-23. PubMed PMID: 15607965. eng.
34. Chen GX, Zhang S, He XH, Liu SY, Ma C, Zou XP. Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives. *Onco Targets Ther*. 2014;7:1901-9. PubMed PMID: 25364261. PMCID: PMC4211860. Epub 2014/10/21. eng.
35. Guo W, Song H. Development of Gene Therapeutics for Head and Neck Cancer in China: From Bench to Bedside. *Hum Gene Ther*. 2018 Feb;29(2):180-7. PubMed PMID: 29334764. eng.
36. Zhang WW, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Hum Gene Ther*. 2018 Feb;29(2):160-79. PubMed PMID: 29338444. eng.
37. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003 Jul;424(6948):516-23. PubMed PMID: 12872134. eng.
38. Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem*. 2007 Jul;282(28):20047-51. PubMed PMID: 17502369. eng.
39. Rusinova I, Forster S, Yu S, Kannan A, Masse M, Cumming H, et al. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D1040-6. PubMed PMID: 23203888. PMCID: PMC3531205. eng.

-
40. Kotredes KP, Gamero AM. Interferons as inducers of apoptosis in malignant cells. *J Interferon Cytokine Res.* 2013 Apr;33(4):162-70. PubMed PMID: 23570382. PMCID: PMC3624694. eng.
 41. Wang BX, Rahbar R, Fish EN. Interferon: current status and future prospects in cancer therapy. *J Interferon Cytokine Res.* 2011 Jul;31(7):545-52. PubMed PMID: 21323567. eng.
 42. Massironi S, Sciola V, Peracchi M, Ciafardini C, Spampatti MP, Conte D. Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *World J Gastroenterol.* 2008 Sep;14(35):5377-84. PubMed PMID: 18803349. PMCID: PMC2744160. eng.
 43. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist.* 2001;6(1):34-55. PubMed PMID: 11161227. eng.
 44. Huang H, Xiao T, He L, Ji H, Liu XY. Interferon- β -armed oncolytic adenovirus induces both apoptosis and necroptosis in cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012 Sep;44(9):737-45. PubMed PMID: 22842821. Epub 2012/07/25. eng.
 45. Qi M, Lu D, Li Y, Qin J, Wang H, Zhang Z, et al. Antitumor effect of recombinant human interferon- β adenovirus on esophageal squamous cell cancer *in vitro*. *Dis Esophagus.* 2014 Feb-Mar;27(2):196-201. PubMed PMID: 23639140. Epub 2013/05/03. eng.
 46. Predina JD, Keating J, Venegas O, Nims S, Singhal S. Neoadjuvant intratumoral immunogene therapy for non-small cell lung cancer. *Discov Med.* 2016 04;21(116):275-81. PubMed PMID: 27232513. eng.
 47. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, et al. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol.* 2005 Jul;6(7):722-9. PubMed PMID: 15951814. eng.
 48. Kalantari T, Kamali-Sarvestani E, Ciric B, Karimi MH, Kalantari M, Faridar A, et al. Generation of immunogenic and tolerogenic clinical-grade dendritic cells. *Immunol Res.* 2011 Dec;51(2-3):153-60. PubMed PMID: 22105838. PMCID: PMC3474330. eng.
 49. Turtle CJ, Hart DN. Dendritic cells in tumor immunology and immunotherapy. *Curr Drug Targets.* 2004 Jan;5(1):17-39. PubMed PMID: 14738216. eng.
 50. Michielsen AJ, Hogan AE, Marry J, Tosetto M, Cox F, Hyland JM, et al. Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoS One.* 2011;6(11):e27944. PubMed PMID: 22125641. PMCID: PMC3220715. eng.
 51. Ramos RN, Chin LS, Dos Santos AP, Bergami-Santos PC, Laginha F, Barbuto JA. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol.* 2012 Sep;92(3):673-82. PubMed PMID: 22636320. eng.
 52. Sandoval R, Xue J, Pilkinton M, Salvi D, Kiyokawa H, Colamonici OR. Different requirements for the cytostatic and apoptotic effects of type I interferons. Induction of apoptosis requires ARF but not p53 in osteosarcoma cell lines. *J Biol Chem.* 2004 Jul;279(31):32275-80. PubMed PMID: 15169789. eng.
 53. Merkel CA, Medrano RF, Barauna VG, Strauss BE. Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Ther.* 2013 May;20(5):317-25. PubMed PMID: 23618951. eng.
 54. Hunger A, Medrano RF, Zanatta DB, Del Valle PR, Merkel CA, Salles TA, et al. Reestablishment of p53/Arf and interferon-. *Cell Death Discov.* 2017;3:17017. PubMed PMID: 28386458. PMCID: PMC5357668. Epub 2017/03/20. eng.
 55. Catani JPP, Medrano RFV, Hunger A, Del Valle P, Adjemian S, Zanatta DB, et al. Intratumoral Immunization by p19Arf and Interferon- β Gene Transfer in a Heterotopic Mouse Model of Lung Carcinoma. *Transl Oncol.* 2016 Dec;9(6):565-74. PubMed PMID: 27916291. PMCID: PMC5143354. eng.
 56. Grizzi F, Bianchi P, Malesci A, Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2013 Jan;19(2):174-84. PubMed PMID: 23345940. PMCID: PMC3547568. eng.

-
57. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1350-6. PubMed PMID: 26457759. PMCID: PMC4636487. Epub 2015/10/12. eng.
 58. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*. 2013 May;19(5):619-25. PubMed PMID: 23584089. eng.
 59. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015 2015 Jan-Feb;65(1):5-29. PubMed PMID: 25559415. Epub 2015/01/05. eng.
 60. Kalyan A, Kircher S, Shah H, Mulcahy M, Benson A. Updates on immunotherapy for colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2018 Feb;9(1):160-9. PubMed PMID: 29564182. PMCID: PMC5848033. eng.
 61. FDA approves first cancer treatment for any solid tumor with a specific genetic feature. 2017.
 62. FDA grants nivolumab accelerated approval for MSI-H or dMMR colorectal cancer 2017 [Available from: <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm569366.htm>].
 63. Xie ZJ, Jia LM, He YC, Gao JT. Morphological observation of tumor infiltrating immunocytes in human rectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2006 Mar;12(11):1757-60. PubMed PMID: 16586547. eng.
 64. Salama P, Phillips M, Grieco F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jan;27(2):186-92. PubMed PMID: 19064967. eng.
 65. Chang WJ, Du Y, Zhao X, Ma LY, Cao GW. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr;20(16):4586-96. PubMed PMID: 24782611. PMCID: PMC4000495. eng.
 66. Brown MC, Holl EK, Boczkowski D, Dobrikova E, Mosaheb M, Chandramohan V, et al. Cancer immunotherapy with recombinant poliovirus induces IFN-dominant activation of dendritic cells and tumor antigen-specific CTLs. *Sci Transl Med*. 2017 Sep;9(408). PubMed PMID: 28931654. eng.

9. Anexos

Um aspecto importante que também envolve a via de p53 se dá pela sua reativação através de alguns fármacos que podem mudar a conformação estrutural de p53 mutada e reativar a via. Além disso, é extremamente relevante buscar novas funções para fármacos antigos, o que reduz o custo de desenvolvimento e o tempo de aprovação. Dentro deste contexto, o estudo da combinação de quinacrina, um anti-malarial da família das acridinas, com inibidores tirosina kinase como sorafenib e regorafenib, proveu ferramentas interessantes para se abordar essa problemática que foi tema do estágio em pesquisa no exterior, e cujo relatório de conclusão do estágio segue no anexo.

Quinacrine and 5-fluorouracil treatment of primary colorectal tumor samples

Paulo Roberto Del Valle¹, Bryan Eric Strauss¹, Wafik El-Deiry²

1. Laboratório de Vetores Virais do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – São Paulo. SP. Brasil

2. Laboratory of Translational Oncology and Experimental Cancer Therapeutics, Department of Medical Oncology and Molecular Therapeutics Program, Fox Chase Cancer Center. Philadelphia. PA. USA.

Summary

Colorectal cancer remains a challenge despite recent advances in treatment. It is the third most common carcinoma and the second cause of cancer related death. Quinacrine, an acridine derivative, is known to target relevant pathways in cancer (p53 and NF- κ B) and there is an interest in repurposing this inexpensive drug as an adjuvant for cancer therapy. Sorafenib and Regorafenib are pan tyrosine kinases inhibitors, targeting VEGF, PDGF c-KIT, RET among others. Despite the broad spectrum of action of these drugs, there is a need to improve efficacy with possibility to reduce toxicity. This work hypothesizes that Quinacrine could inhibit the mechanisms of resistance to Sorafenib and Regorafenib. **Experimental design.** Colorectal cancer cell lines (HCT116 p53wt and HT29 p53mut) and liver cancer cell lines (HEP3B p53wt and HEPG2 p53 null) was used in this study. **Results and discussion.** All tested drugs reduce cell viability and proliferation in a dose dependent manner. The drug combinations show synergy for some of the doses tested (combination index lower than 0.6). Doses as low as 5 μ M (Quinacrine) and 15 μ M (Sorafenib and Regorafenib), which individually induce only cell cycle arrest (G2/M for Quinacrine; G1 arrest for Sorafenib or Regorafenib), when combined induce marked cell

death (more than 70%), as observed in sub-G1 and proliferation assays. Inhibition of caspases (Z-VAD) and caspase 8 (Z-IETD-FMK) strongly abolish the cell death, and the induction of cleaved-PARP and cleaved-caspase 3 suggests apoptosis. The combination is still able to induce p53 targets even in mutant cell lines (ex. P21, NOXA, PUMA, DR5 in HT29). It also inhibits the NF- κ B pathway (p-65, MCL1, FLIP and XIAP), as well as reduces p-AKT. DNA damage (γ -H2AX) was strongly observed exclusively upon combined treatments. A marker of autophagic flux, LC3-B, accumulates with Quinacrine and this accumulation further increases with the combination. **Conclusion.** Quinacrine synergizes with Sorafenib and Regorafenib. This synergy may be dependent on inhibition of autophagy at late stages.

Support by: FAPESP processo n° 2016/04446-1

Introduction

Colorectal cancer remains a challenge despite recent advance in treatment. It is the third most common carcinoma and about half of all cases will eventually evolve to metastasis, independent of treatment, making it the second cause of cancer related death (70). Surgery is the main form of treatment, sometimes followed by chemotherapy and/or radiotherapy. However, many cases are asymptomatic at initial stages, resulting in advanced disease at diagnosis, thus lowering the success of treatment. Even though efforts for prevention of colorectal cancer should be stimulated and made widely available, the immediate challenge still lies in choosing the right treatment for today's patients.

A plethora of genetic alterations have been linked to the development and progression of colorectal cancer, yet three different pathogenic mechanisms have been proposed. Chromosomal instability (CIN) is responsible for 85% of all cases, whereas microsatellite instability (MSI) and the presence of a CpG methylator phenotype (CIMP) are responsible for the majority of the remaining cases. All of these phenotypes eventually lead to the disruption of balance between tumor suppressor and oncogene pathways (71).

Among the driver genes, the tumor suppressor gene p53 has proved to be important in colorectal carcinoma and in the tumorigenesis of several other cancers. Mutations in the p53 gene occur in 34% of colorectal carcinomas of the proximal colon and in 45% of the distal colon cases. Moreover, different p53 mutations can be associated with clinical status, such as invasive depth, site of metastasis or even patient prognosis (72).

The induction and activation of p53 occurs in response to cellular stress. Under normal circumstances, p53 is maintained at low levels mainly by MDM2 (also a transcriptional target of p53), which directs p53 for degradation in the proteasome. On the other hand, under conditions of stress or hyperproliferative signals, the activation of p53 relies, in part, on the Arf protein, which disrupts the p53-MDM2 interaction, separating it from p53 present in nucleoplasm (29). Once activated, such as in the case of a non-repairable damage, p53 can induce cell death by both the intrinsic (with mitochondrial recruitment) and extrinsic (via cell death receptors) pathways (73).

Due to its major role in inducing cell death, several attempts have been made to rescue p53 function via pharmacological approaches. These strategies can interfere directly with the interaction of p53 and MDM2, exemplified by MDM2 Inhibitors (MI-43 and MI-219) or Nutlins, allowing p53 to stabilize and exert its transcriptional functions. Other strategies rely on the recruitment of the p53-like activity of p63 or p73, members of the p53 family with high levels of homology. In some experiments, this recruitment resulted in the strong induction of cell death regardless of the p53 mutation status (74). Further, rescuing normal function of mutated p53 may be a goal of some novel compounds. PRIMA-1 successfully restored the sequence-specific DNA-binding by forming adducts with thiols in mutated p53 and consequently several p53 target genes were activated (75). Its methylated form, PRIMA-1^{MET}, is the first small molecule to restore p53 activity to be tested in a phase I/II clinical trial for hematologic malignancies and prostate cancer (76).

The first small molecule to restore the wild type functions of mutated p53 was CP-31398 (77). When comparing molecules that use an acridine scaffold to

mimic the structure of CP-31398, Dr. El-Deiry's group found that Quinacrine was able to rescue p53 from proteosomal degradation and induce expression of target genes, including DR5 (78). They also observed that Quinacrine can induce p53-dependent and independent cell death. Hepatocellular carcinoma cell lines HepG2, Hep3B and Huh7 did not die even after two days of treatment with 10-20mM Quinacrine and these cells lines are resistant to TRAIL. However, the association of this molecule with Quinacrine led to high levels of cell death in just four hours. Among the mechanisms, it was found that DR5, the TRAIL receptor, was increased while Mcl-1, a member of Bcl1 family with anti-apoptotic functions, was decreased upon quinacrine treatment (79).

Quinacrine (IUPAC name 4-N-(6-chloro-2-methoxyacridin-9-yl)-1-N,1-N-diethylpentane-1,4-diamine) is a three-ring heterocyclic compound, derived from acridine. It was first studied as antiprotozoal agent and during World War II thousands of soldiers took it for malaria prophylaxis, as a substitute for quinine, making Quinacrine one of the most studied drugs (80). Quinacrine is promptly absorbed from culture media and accumulates in acidic intracellular compartments. There its amine residue suffers protonation, causing Quinacrine to be trapped inside these compartments, which has the potential to buffer and inhibit autophagic flux (81).

Among the emerging therapeutic options for colorectal cancer are Sorafenib and Regorafenib. These drugs are pan-tyrosine kinase inhibitors, with major function as anti-angiogenics. Sorafenib has as targets VEGFR, PDGFR, c-Kit, RET and Regorafenib targets VEGFR, FGFR, PDGFR, EGFR, TIE-2, BRAF, RAF, RET and KIT and both drugs inhibits Mek/Erk pathway (82, 83). Both drugs have approval for the treatment of hepatocellular carcinoma and Regorafenib has

FDA approval for metastatic and refractory colorectal cancer; Sorafenib is in clinical testing, alone or in combination, for the treatment of colorectal cancer.

Despite the benefits that Regorafenib and Sorafenib can offer, there is still a need to evaluate their combination with other drugs in order to reduce toxicity, improve efficacy and gain insights on their mechanisms of action. Both drugs can induce autophagy, which can lead to cell death or survival, depending on the complex crosstalk between different intracellular signaling pathways. However, there is some evidence in the literature indicating that inhibition of autophagy can overcome resistance to Sorafenib (84, 85) (86). As it is extremely dependent on the cellular signaling context and considering the pro-apoptotic signals induced by Quinacrine, we hypothesize that combining Quinacrine with pan-tyrosine kinases inhibitors could act synergistically to induce cell death.

Methods

Chemicals and reagents.

Quinacrine and propidium iodide were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Sorafenib (Nexavar) was synthesized at the Medical University of Southern Carolina by Dr. Charles D. Smith. Regorafenib was purchased from MedChem Express (Monmouth Junction, NJ). DMEM, EMEM, McCoy's 5A, PBS, were purchased from Hyclone GE (Logan, Utah). Fetal bovine serum and trypsin were bought from Gemini Bio-Products (West Sacramento, CA). D-Luciferin (K+) was purchased from Gold Biotechnology (St. Louis, MO). The following antibodies were used: γ H2AX (Ser139), cleaved caspase-3, cleaved PARP, Mcl-1, phospho-AKT (Ser473), phospho-p65 (Ser536), XIAP, FLIP, NOXA, DR5, PUMA, BAX, phospho-RB (Ser807/811), LC3B, Beclin, p62,

CHOP (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); Ran (BD PharMingen, San Diego, CA); p53 HRP, p21 (F-5) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). MCL1 (Y37) (Abcam Cambridge, MA). Antigens were detected using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and chemiluminescent substrates (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Cell Culture

Cell lines were purchased from ATCC. Colorectal cancer cell lines HCT116, HCT116 p53^{-/-} and HT29 were cultivated with McCoy's Media (Gibco); Liver cancer cell lines HEP3B and HEPG2 were cultivated with EMEM (Gibco) supplemented with ampicillin/streptomycin and 10% FBS (Gibco). Cells were maintained in 5% CO₂ at 37°C in a humidified incubator. Cell lines were routinely tested for mycoplasma.

Cell viability assays

In order to test the cell viability upon drug treatments, CellTiter-Glo (Promega) was used. This test uses intracellular ATP to generate a luminescent signal that is indicative of metabolic active cells. Luminescent signal was collected using an IVIS imaging system.

Western Blot

For protein gel blots, cells were collected, lysed using RIPA buffer, protease inhibitors (cOmplete, mini. Roche) and phosphatase inhibitor (PhoSTOP, Roche). Protein was quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Life Technologies) and equal amounts of protein were loaded into NuPage Bis-Tris Gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) and run under standard SDS-PAGE conditions using the XCell system (Invitrogen). Proteins were transferred to an Immobilon-P PVDF membrane (Millipore) with a transfer apparatus (Bio-Rad). The membranes were blocked with 10% (w/v) nonfat dry milk, incubated with primary antibody overnight at 4°C and subsequently incubated with horseradish peroxidase-labeled secondary antibody for 1 h at room temperature. The signal was generated using chemiluminescent substrates (Thermo) and images were obtained using a Syngene imaging system.

Cell cycle profile

Both adherent cells and floating cells were collected following treatment and fixed with ethanol. Following fixation, the cells were treated with RNase and stained with propidium iodide and their DNA content measured using an Epics Elite flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Immunofluorescence

Ten-thousand cells were plated in chamber slides under sterile conditions and treated as indicated. At end point, cells were fixed using BD Cytofix/Cytoperm according to the manufacturer's protocol. Following fixation, cells were incubated with an anti MCL1(Y37) antibody (Abcam) at 1:200 overnight, rinsed, incubated

with a Cy5 secondary antibody at 1:250 for 1h, stained with DAPI at 1 $\mu\text{g/mL}$ for 5 minutes, rinsed, and imaged.

Colonosphere culture

Cells ($1 \times 10^3 - 2 \times 10^4$ per well) were seeded in MammoCult Human Medium (STEMCELL Technologies) in Ultra Low attachment plates (Corning) as per the manufacturer's protocol. Colonospheres of size $> 60 \mu\text{m}$ were imaged 3-7 days after seeding.

***In vivo* treatments**

Four to six week old female athymic NCr-nu/nu mice (Charles River, Germantown, MD) were used for all studies. The mice were housed and maintained in accordance with the Pennsylvania State University College of Medicine Institutional Animal Care and Use Committee and state and federal guidelines for the humane treatment and care of laboratory animals. For each xenograft, 1.5×10^6 HT29-luc cells together with Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) were injected subcutaneously into the right and left flanks of each mouse for a total volume of 200 μL per injection (50% cell suspension in PBS, 50% Matrigel). Five days after tumor injection (once tumors were palpable and growing), mice were randomized into groups of five mice (10 tumors/group) and treatment initiated. Quinacrine was prepared in a 5% (w/v) sucrose/PBS solution and administered via oral gavage. Sorafenib and Regorafenib were prepared in a 12.5% Cremaphor/12.5% Ethanol/75% H_2O solution and also administered via gavage. Tumor progression was monitored by digital calliper measurements, and tumor volume was calculated according to the modified formula for ellipsoid

volume (volume = (length $\times$ width²)/2). Treatment doses followed previous publication, using orally delivered Quinacrine 100mg kg⁻¹ every other day combined with a weekly dose of 20 mg kg⁻¹ Sorafenib or 5mg kg⁻¹ Regorafenib (79, 87, 88).

Results

Quinacrine is toxic to tumor cells

We initially defined the IC₅₀ for Quinacrine for colorectal cancer cell lines HCT116 and HT29 and hepatocellular cell lines HEPG2 and HEP3B. HCT116 and HEPG2 present wild type p53, HT29 has a mutation (R273H) in p53 and HEP3B is null for p53. Despite their differences in p53 status, they presented similar dose response curves with IC₅₀ ranging from 1 to 2.5 μ M (**Figure 1a**). Quinacrine also inhibits the colony formation in HCT116 and HT29. When treated for six days (i.e. when we do not change the media after the treatment), no colony was formed (data not shown), even at the lowest dose tested, but we do see a dose dependent effect when changing the media after 24h treatment (**Figure 1b**).

Figure 1. Quinacrine reduces cell viability and inhibits colony formation. **a.** Indicated cell lines were plated (2.5×10^4 cells/well) and cell viability measured after 72h using CellTiter-Glo. **b.** Colony formation assay, 200 cells were plated in six well plates, after 24h Quinacrine was added at indicated concentrations. After 24h treatment media was changed and cells allowed to grow for six days before staining with Coomassie Blue.

Figure 2. Quinacrine induces p53 and inhibits NF- κ B. **a.** Expression of proteins in response to Quinacrine (Quin) over time. Two hundred thousand cells were plated and after 24h treated with Quinacrine at 15 μ M and collected at indicated time points. **b.** Immunofluorescence showing reduced expression of MCL1 in cell lines (ten thousand cells in 8 wells chamber slides) treated with Quinacrine 20 μ M for 24h.

Figure 3. Quinacrine accumulates in intracellular acidic vesicles. HCT116 and HCT116 p53^{-/-} were treated with 7.5 μ M or, for HT29, 5 μ M Quinacrine (Quin) **a**. Organoid images taken after 48h treatment. Two thousand cells were plated in low attachment 6 well plates and cultivated with MammoCult media (StemCell Inc.). After 6 days, organoids were treated with Quinacrine as indicated. Images at 100x. **b**. Cell lines were plated (Two hundred thousand cells/well in 6 well plates) and treated as indicated with Quinacrine or Quinacrine plus bafilomycin A (100nm). Images were taken after 6 hours, 200x.

As expected, Quinacrine inhibits NF- κ B, indicated by reduction of phosphorylation of p65, inhibits MCL1 expression (a downstream target of NF- κ B) and stabilizes expression of p53, except for the p53 null cell line HEP3B (**Figure 2**). When we look at culture organoids for HCT116 and HT29, Quinacrine distributes equally throughout the structure (**Figure 3a**). But when examined in a 2-D system, Quinacrine accumulates in acidic compartments, and its accumulation is inhibited by Bafilomycin A, a H⁺ ATPase transporter inhibitor (**Figure 3b**).

Quinacrine synergizes with Sorafenib and Regorafenib

We further evaluated whether Quinacrine could synergize with Sorafenib and Regorafenib. For that, we constructed isobolograms to quantify the synergy and observed that the synergy occurs at the highest possible dose of Quinacrine but does not induce cell death (**Figure 4a**). Interestingly, the combination drastically reduces cell viability (**Figure 4b**) with marked cell death, cleavage of caspase 3 and Parp (**Figure 5a, b**), yet the single treatments only induce cell arrest. Treatment with pan caspase or caspase 8 inhibitors abolishes cell death induced by the drug combinations (**Figure 5c**). Single doses induce cell cycle arrest, for G2/M for quinacrine or G1 for Sorafenib and Regorafenib (**Figure 5d**).

Figure 4. Synergy between Quinacrine, Sorafenib, and Regorafenib. a. Cell viability evaluated after 48h of treatment using CellTiter-Glo. Fifty thousand cells were plated and after 24h treated with Quinacrine (10; 5; 2.5 and 1.25 μ M) alone or in combination with Sorafenib and Regorafenib (20; 10; 5 and 2.5 μ M). **b.** Growth curves of cells treated alone or in combination evaluated via MTT. Ten thousand cells were plated and treated after 24h (T=0 day of treatment). HCT116 Quinacrine (Q) = 7.5 μ M. HT29, HEPG2 and HEP3B Q= 5 μ M. Sorafenib (S) and Regorafenib (R) = 15 μ M.

Figure 5. Drug combination induces apoptosis. **a.** Sub-G1 population evaluated after 72h treatment. Two hundred thousand cells/well were plated in 6 well plates, after 24h cells were treated with indicated drugs. Quin = Quinacrine; Sor = Sorafenib; Reg = Regorafenib; drug doses in μM . **b.** Apoptotic markers exclusively expressed in drug combinations after 72h treatment. **c.** Inhibition of pan-caspases (Z-VAD) or caspase 8 (Z-IETD-FMK) activity inhibits cell death. **d.** Representative images of cell cycle analysis at 48h.

All investigated p53 transcriptional targets (p21, Noxa, DR5, Puma and Bax) presented increased expression despite p53 mutant status in HT29 (except for Bax in this cell line). However, combinations diminished the intensity of expression when compared with Quinacrine alone, but their expression was also higher than untreated cells (**Figure 6**). Interesting, the diminished phospho-Rb observed in HCT116, in all conditions, was seen only when HT29 cells were subjected to drug combinations. At 48h, the combination treatments induced marked DNA damage, as observed by γ -H2AX.

Figure 6. Quinacrine restores the p53 pathway. Expression of p53 target proteins is rescued after treatment with Quinacrine. Two million cells/dish were plated and after 24h treated for

48h with Quinacrine (HCT116 7.5 μ M; HT29 5 μ M) alone or in combination with Sorafenib and Regorafenib 15 μ M.

The NF- κ B pathway is another quinacrine target, and we observed low levels of proteins (FLIP, MCL1, XIAP) whose expression is known to be induced upon activation of this pathway (**Figure 7**). Each cell line respond in a different manner, since an FLIP expression increases in HT29 and XIAP in HCT116 when these cell lines are treated with Quinacrine alone. However, alterations in this pathway exclusive to combined drug treatments were not observed.

Figure 7. Quinacrine inhibits the NF- κ B pathway. Expression of NF- κ B target proteins is inhibited after treatment with Quinacrine. Two million cells/dish were plated and, after 24h, treated for 48h with Quinacrine (HCT116 7.5 μ M; HT29 5 μ M) alone or in combination with Sorafenib and Regorafenib 15 μ M.

Another important aspect of Quinacrine is its ability to inhibit autophagy. We confirm that Quinacrine induces accumulation of LC3-II over time (**Figure 8a**). This accumulation is increased in combination treatment at 48h, when it is also possible to observe accumulation of p62. Beclin 1, an initiator of autophagy, is increased when cells were treated with Quinacrine, but is slightly inhibited by the drug combinations (**Figure 8b**). We also observed a reduction of phosphorylation of Akt in both cell lines treated with tyrosine kinase inhibitors and an induction of CHOP which was slightly reduced when combined with Quinacrine (**Figure 8b**).

Figure 8. Quinacrine inhibits autophagy. a. LC3 expression changes over time in HCT116. **b.** Expression of some autophagy-related proteins. Two million cells/dish were plated and, after 24h, treated for 48h with Quinacrine (HCT116 7.5 μ M; HT29 5 μ M) alone or in combination with Sorafenib and Regorafenib 15 μ M.

Given the potential synergy observed *in vitro*, we investigated these drug combinations *in vivo*. For this, when s.c. HT29 tumors in Nude mice were palpable, we initiated the treatment using doses established previously in the lab.

Quinacrine was administered orally via gavage at 100mg/kg every 48h; Sorafenib was administered at 20mg/kg daily and Regorafenib was given 5mg/kg daily. During the treatment, body weight was measured and all animals presented weight loss, with control animals losing around 5%, but all treated animals showed more than 10% of weight loss. After 6 treatment days some animals presented more than 20% of weight loss and treatment was stopped. Quinacrine alone provoked a more intense weight loss (**Figure 9a**). Concerning the tumor sizes, the combination with Sorafenib did not present a benefit when compared to Sorafenib alone, but Quinacrine did not inhibit the effects of Sorafenib. However, the combination of Quinacrine with Regorafenib inhibited the tumor growth while single drugs did not (**Figure 9b**). In order to evaluate possible toxicity, we investigated whether the doses used to treat HCT116 *in vitro* would alter cellular viability in a normal colon cell line (CCD 841 CON) and in two lung fibroblast cell lines (WI-38 and MCR-5). Sorafenib and Regorafenib alone slightly inhibited proliferation, while Quinacrine was toxic to all cell lines, including when combined with other drugs. (**Figure 9c**).

Figure 9. Quinacrine and drug combinations can be toxic. One million, five hundred thousand HT29 cells were injected s.c. along with 50% matrigel in DPBS. When tumors reached 200mm³ (5 days after tumor injection), treatment was initiated. All drugs were given orally via gavage, Quinacrine dose was 100 mg/kg on alternating days; Sorafenib was given 20mg/kg daily and Regorafenib was given 5mg/kg daily. The treatment lasted 7 days. **a.** Animal weight change. **b.** Tumor volume measured with a caliper each two days. **c.** Growth curves of normal cell lines treated alone or in combination evaluated via MTT. Ten thousand cells/well were plated and treated after 24h (T=0 day of treatment). Quinacrine (Q) = 7.5 μ M, Sorafenib (S) and Regorafenib (R) = 15 μ M.

Discussion

This is the first work exploring the synergy of Quinacrine in combination with Sorafenib or Regorafenib to colorectal cancer. Sorafenib and Regorafenib are pan tyrosine kinase inhibitors, with strong anti-angiogenesis effects. While these drugs can offer some benefits to patients, eventually tumor cells develop resistance to these therapies, especially if the patient already received another targeted therapy. Here, we observed that combining these drugs with Quinacrine may target important pathways in cancer, such as p53 and NF- κ B, and inhibit autophagy, one of the possible resistance mechanisms for Sorafenib and Regorafenib.

The drug doses are comparable with other studies describing the induction of cell cycle arrest at the IC₅₀ between 1 to 5 μ m (87). Indeed, even at a higher dose, Quinacrine only induces cell arrest. Sorafenib and Regorafenib alone also did not induce cell death, but only cell arrest. Such findings had already been observed for single doses for these drugs, compatible with the induction of p21 and reduction of phosphorylation of RB seen here.

Noteworthy is the induction of cell death in combination while individual treatments induce cell cycle arrest. During mitosis, reduced autophagy is thought to prevent capture of exposed chromosomes or essential organelles (89, 90). This process may be regulated by CDK1 which induces phosphorylation of Vsp34, blocking its interaction with Beclin 1 and consequently inhibiting the formation of the autophagosome (89). Since Quinacrine blocks the resolution of autophagic vacuoles, we speculate that this may add other signals that contribute to G2/M arrest. On the other side, Sorafenib and Regorafenib induced a marked

G1 arrest, which is in accordance with ERK/MAPK pathway blockage by these drugs leading to senescence or the induction of autophagy. While both fates could seem contradictory, autophagy could be a way for cells to evade senescence, thus exposing a mechanism of resistance to these drugs (91). Interestingly, when cell death induced by the combination is inhibited by using a pan caspase inhibitor, cells accumulate in S/G2M, which can indicate that the arrest induced by tyrosine kinases inhibitors do not last as long as those induced by Quinacrine.

One important aspect observed is the relation of Quinacrine with the p53 pathway. It is known that p53 is highly mutated in colorectal cancer, with implications in response to chemotherapy and survival (72). Here, Quinacrine was able to stabilize p53 and induce expression of important p53 targets such as p21, DR5, Noxa and Bax. Despite HT29 presenting a mutation in p53 (R273H), localized in the DNA binding site with some suggestions of gain of function, Quinacrine was associated with the induction of p53 target gene expression. However, as Quinacrine induces accumulation of impaired autophagosomes, this could explain the accumulation of mutant p53, since autophagy is one way to eliminate it (92). In addition, several studies show Quinacrine directly interacting with DNA or nuclear enzymes. These interactions may trigger damage responses that could also result in the activation of the p53 pathway, even in the absence of p53 (80).

In vivo, the combination of Quinacrine and Regorafenib presented a synergistic arrest in HT29 tumor growth. This is interesting because Regorafenib is already approved for metastatic refractory colorectal cancer. However, despite

using drug doses that did not induce much toxicity in previous studies, we observed significant weight reduction, which was higher with Quinacrine. As we also observed a reduction of viability in normal cell lines with Quinacrine and drug combinations, it is important to establish a proper regimen for these combinations *in vivo*. Alternatively, the evaluation of Quinacrine analogues may prove to be important, especially given the observed toxicity. Nevertheless, all drugs studied here are approved for use in humans and general toxicity is well known and manageable.

One limitation of this work is that we did not evaluate how a genetic interference of crucial genes related to autophagy impacts the response to Sorafenib and Regorafenib. However, several studies indicate that silencing ATG5, ATG7 or Beclin 1, or even using other autophagy blockers, such as chloroquine, increases cell death upon Sorafenib treatment (86, 93-95). Another limitation is the toxicity observed *in vivo*. As the doses used have already been described as non-toxic (87, 88), we speculate that other factors, such as gavage itself, the total volume used or even the therapeutic scheme may be manipulated to avoid toxicity. Notably, Quinacrine accumulates in tissues, as liver presented 20000 times higher concentration than seen in plasma (80), thus it is hard to speculate if the dose used *in vitro* for the normal cell lines would be toxic to normal tissues *in vivo*.

Nevertheless, this work explores how Quinacrine, a relatively inexpensive and well-known drug, can synergize with antiangiogenics such as Sorafenib and Regorafenib. Since Quinacrine can inhibit autophagy caused by tyrosine kinase

inhibitors, it will be interesting to evaluate other analogs or autophagy blockers in the context of antiangiogenic therapies.

Impact on the current PhD project

One of the crucial aspects of the project “p53/Arf and Interferon-beta pathways as targets to colorectal cancer” is the evaluation of immunogenic cell death. Previous results from our group indicate that combining a strong immune modulator, such as interferon beta, with an inducer of cell death, such as p19^{arf}, has major implications on activation of an immune response against tumors due to the induction of immunogenic cell death seen only upon combined gene transfer.

Immunogenic cell death can be evaluated through some important markers, such as the cell surface presentation of calreticulin or release of HMGB1 and ATP (96). One of the main sources of ATP is autophagy, as it can also contribute to the generation of antigenicity and act as an adjuvant for immunogenic cell death (97).

Since Quinacrine not only inhibits the autophagic flux, but also inhibits NF- κ B, it could be used as a strong inhibitor of immunogenic cell death, while preserving the activation of p53 pathway. Indeed, it is a strong immune suppressor, as it was used for lupus and rheumatoid arthritis. At least, on theory, the use of Quinacrine can be a valuable tool as a control to assess the benefits of the combined gene therapy.

Bibliography

70. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar;65(2):87-108. PubMed PMID: 25651787. eng.
71. Sokolova V, Crippa E, Gariboldi M. Integration of genome scale data for identifying new players in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan;22(2):534-45. PubMed PMID: 26811605. PMCID: PMC4716057. eng.
72. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2005 Oct;23(30):7518-28. PubMed PMID: 16172461. eng.
73. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Jun;13(3):332-7. PubMed PMID: 11343904. eng.
74. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*. 2015 Jan;21(1):84-93. PubMed PMID: 25574081. PMCID: PMC4284363. eng.
75. Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med*. 2002 Mar;8(3):282-8. PubMed PMID: 11875500. eng.
76. Lehmann S, Bykov VJ, Ali D, Andrn O, Cherif H, Tidefelt U, et al. Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2012 Oct;30(29):3633-9. PubMed PMID: 22965953. eng.
77. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science*. 1999 Dec;286(5449):2507-10. PubMed PMID: 10617466. eng.
78. Wang W, Ho WC, Dicker DT, MacKinnon C, Winkler JD, Marmorstein R, et al. Acridine derivatives activate p53 and induce tumor cell death through Bax. *Cancer Biol Ther*. 2005 Aug;4(8):893-8. PubMed PMID: 16177561. eng.
79. Wang W, Gallant JN, Katz SI, Dolloff NG, Smith CD, Abdulghani J, et al. Quinacrine sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL and chemotherapeutic agents. *Cancer Biol Ther*. 2011 Aug;12(3):229-38. PubMed PMID: 21725212. eng.
80. Ehsanian R, Van Waes C, Feller SM. Beyond DNA binding - a review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers. *Cell Commun Signal*. 2011 May;9:13. PubMed PMID: 21569639. PMCID: PMC3117821. Epub 2011/05/15. eng.
81. Parks A, Charest-Morin X, Boivin-Welch M, Bouthillier J, Marceau F. Autophagic flux inhibition and lysosomogenesis ensuing cellular capture and retention of the cationic drug quinacrine in murine models. *PeerJ*. 2015;3:e1314. PubMed PMID: 26500823. PMCID: PMC4614855. Epub 2015/10/06. eng.
82. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Oct;5(10):835-44. PubMed PMID: 17016424. eng.
83. Davis SL, Eckhardt SG, Messersmith WA, Jimeno A. The development of regorafenib and its current and potential future role in cancer therapy. *Drugs Today (Barc)*. 2013 Feb;49(2):105-15. PubMed PMID: 23462625. eng.
84. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, et al. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in

- hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2012 Aug;131(3):548-57. PubMed PMID: 21858812. Epub 2011/09/12. eng.
85. Shi YH, Ding ZB, Zhou J, Hui B, Shi GM, Ke AW, et al. Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma via ER stress-related apoptosis. *Autophagy*. 2011 Oct;7(10):1159-72. PubMed PMID: 21691147. Epub 2011/10/01. eng.
86. Prieto-Domínguez N, Ordóñez R, Fernández A, García-Palomo A, Muntané J, González-Gallego J, et al. Modulation of Autophagy by Sorafenib: Effects on Treatment Response. *Front Pharmacol*. 2016;7:151. PubMed PMID: 27375485. PMCID: PMC4896953. Epub 2016/06/08. eng.
87. Gallant JN, Allen JE, Smith CD, Dicker DT, Wang W, Dolloff NG, et al. Quinacrine synergizes with 5-fluorouracil and other therapies in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2011 Aug;12(3):239-51. PubMed PMID: 21725213. eng.
88. Abdulghani J, Gokare P, Gallant JN, Dicker D, Whitcomb T, Cooper T, et al. Sorafenib and Quinacrine Target Anti-Apoptotic Protein MCL1: A Poor Prognostic Marker in Anaplastic Thyroid Cancer (ATC). *Clin Cancer Res*. 2016 Dec;22(24):6192-203. PubMed PMID: 27307592. Epub 2016/06/15. eng.
89. Furuya T, Kim M, Lipinski M, Li J, Kim D, Lu T, et al. Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Mol Cell*. 2010 May;38(4):500-11. PubMed PMID: 20513426. PMCID: PMC2888511. eng.
90. Eskelinen EL, Prescott AR, Cooper J, Brachmann SM, Wang L, Tang X, et al. Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic*. 2002 Dec;3(12):878-93. PubMed PMID: 12453151. eng.
91. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res*. 2015;35(6):600-4. PubMed PMID: 26096166. Epub 2015/06/22. eng.
92. Vijayakumaran R, Tan KH, Miranda PJ, Haupt S, Haupt Y. Regulation of Mutant p53 Protein Expression. *Front Oncol*. 2015;5:284. PubMed PMID: 26734569. PMCID: PMC4681805. Epub 2015/12/17. eng.
93. Yi H, Ye T, Ge M, Yang M, Zhang L, Jin S, et al. Inhibition of autophagy enhances the targeted therapeutic effect of sorafenib in thyroid cancer. *Oncol Rep*. 2018 Feb;39(2):711-20. PubMed PMID: 29207150. Epub 2017/11/28. eng.
94. Hao H, Zhang D, Shi J, Wang Y, Chen L, Guo Y, et al. Sorafenib induces autophagic cell death and apoptosis in hepatic stellate cell through the JNK and Akt signaling pathways. *Anticancer Drugs*. 2016 Mar;27(3):192-203. PubMed PMID: 26629768. eng.
95. Yuan H, Li AJ, Ma SL, Cui LJ, Wu B, Yin L, et al. Inhibition of autophagy significantly enhances combination therapy with sorafenib and HDAC inhibitors for human hepatoma cells. *World J Gastroenterol*. 2014 May;20(17):4953-62. PubMed PMID: 24833845. PMCID: PMC4009527. eng.
96. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 2014 Oct;3(9):e955691. PubMed PMID: 25941621. PMCID: PMC4292729. Epub 2014/12/13. eng.
97. Bloy N, Garcia P, Laumont CM, Pitt JM, Sistigu A, Stoll G, et al. Immunogenic stress and death of cancer cells: Contribution of antigenicity vs adjuvanticity to immunosurveillance. *Immunol Rev*. 2017 Nov;280(1):165-74. PubMed PMID: 29027230. eng.