RUAN FELIPE VIEIRA MEDRANO

**Investigação da resposta imunológica antitumoral induzida por células
B16F10 tratadas pela combinação p19Arf e Interferon-beta em um modelo de
vacinação profilático para melanoma murino**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Oncologia

Orientador: Dr. Bryan Eric Strauss

São Paulo

2013

RUAN FELIPE VIEIRA MEDRANO

**Investigação da resposta imunológica antitumoral induzida por células
B16F10 tratadas pela combinação p19Arf e Interferon-beta em um modelo de
vacinação profilático para melanoma murino**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Oncologia

Orientador: Dr. Bryan Eric Strauss

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Medrano, Ruan Felipe Vieira

Investigação da resposta imunológica antitumoral induzida por células B16F10 tratadas pela combinação p19Arf e interferon-beta em um modelo de vacinação profilático para melanoma murino / Ruan Felipe Vieira Medrano. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Bryan Eric Strauss.

Descritores: 1.Melanoma experimental 2.Neoplasias 3.Vacinas anti-câncer
4.Interferon tipo I 5.Proteína supressora de tumor p53 6.Morte celular 7.Camundongos endogâmicos C57BL

USP/FM/DBD-065/13

DEDICATÓRIA

Assim como todas as minhas conquistas, este trabalho também é dedicado à minha mãe e ao meu pai. Eles podem não ser cientistas, mas pela dedicação e esforço que sempre mostram no trabalho, me ensinaram como quero fazer ciência.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Bryan Strauss, por ter acreditado no meu potencial ao me propor este projeto. Com certeza a compreensão dos conceitos da imunologia de tumores, oncologia molecular e experimental foi um desafio gratificante. Também o agradeço por valorizar seus alunos e por se empenhar com o nosso desenvolvimento científico. Espero um dia poder conduzir o meu laboratório de maneira similar.

Agradeço aos junior's Thiago Salles, Paulo Del Valle e João Paulo Catani pelos divertidos jantares no bandeirão, pelas palhaçadas e por se preocuparem comigo. Desejo que continuemos à estimular e contribuir com o trabalho do outro por muitos anos.

Agradeço à paciência quase inesgotável e ao auxílio sempre presente dos companheiros e amigos do Laboratório de Vetores Virais. Obrigado Aline Hunger, Daniela Zanatta, Taynah Ibrahim, Igor Luna, Rodrigo Tamura, Marlous Lana, Rafael Soares e Christian Merkel. Prometo que no doutorado dar menos trabalho à vocês.

Aos técnicos, funcionários, alunos, pesquisadores e professores do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – Incor. O ambiente profissional e funcional gerado pelo trabalho de vocês foi imprescindível para a realização deste trabalho. Em especial agradeço ao amigo Vinicius Bassaneze por me ensinar a trabalhar no FACS.

Aos membros da comissão organizadora do I Curso de Inverno de Oncologia Molecular da FMUSP os meus sinceros e felizes agradecimentos. Realizar este curso foi muito marcante na minha pós-graduação, não vou esquecer a cerimônia de encerramento, sentir a satisfação dos alunos com o curso foi muito gratificante. Obrigado Danielle Fontes, Irina Bobrovnitchaia, João Paulo Catani, Liliane Rossi, Michelly Pereira, Paulo Del Valle, Rafael Ikemori, Renata Saito, Rita de Cássia, Rodrigo Aguiar, Silvina Bustos, Simone Crestoni, Thiago Buosi e Úrsula Urias.

Ao amigo Valter Feitosa pelas ressacas, pela minuciosa correção textual e principalmente pelo companheirismo. Pode ter certeza que você é ponta firme.

À Professora Eugênia Costanzi-Strauss por abrigar em seu laboratório os camundongos Nudes necessários para produção dos anticorpos.

Ao aluno Jonatan Ersching e Professor Mauricio Rodriguez agradeço pela colaboração com a produção dos anticorpos anti-CD4 e anti-CD8.

Ao Professor Roger Chammas e seus alunos por compartilhar não apenas reagentes e equipamentos, mas também conhecimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado e por financiar o trabalho.

Por fim, agradeço à amizade do meu irmão Rodrigo, o carinho e exemplo da minha Vó Toninha e o amor do meu pai e da minha mãe. Obrigado por todo o apoio. A realização deste trabalho é uma vitória nossa. Seremos todos mestres!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	5
OBJETIVOS.....	21
JUSTIFICATIVA.....	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
RESULTADOS.....	32
DISCUSSÃO	70
CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO I – Comprovante de Aprovação pelo Comitê de Ética.....	89
ANEXO II – <i>Curriculum Vitae</i>	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de imuno edição tumoral	6
Figura 2. Vias de sinalização ativadas pelos Interferons do tipo I e II	12
Figura 3. Representação do mecanismo de apoptose induzida por IF.	14
Figura 4. Representação esquemática do locus INK4b-Arf-INK4a.....	15
Figura 5. Representação esquemática da via Arf-Mdm2-p53.....	17
Figura 6. Ensaio de imunofluorescência para detecção da proteína p19Arf	33
Figura 7. Elisa para detecção de IFN β	34
Figura 8. Efeitos da radiação gama sobre a viabilidade e ciclo celular	35
Figura 9. Estimulação do promotor PG em resposta à radiação Gama	36
Figura 10. Indução de morte celular pela combinação IFN β e p19Arf	39
Figura 11. Progressão tumoral no sítio do desafio	41
Figura 12. Progressão tumoral diminuída no sítio do desafio após vacinação com células transduzidas pelo vetor AdPGIFN β IRESp19	43
Figura 13. Indução de morte da celular pela co-transdução dos vetores monocitrônicos AdPGP19 e AdPGIFN β	45
Figura 14. Proteção antitumoral induzida pela vacinação profilática com células co-transduzidas pelos vetores AdPGp19 e AdPGIFN β	48
Figura 15. Investigação de possíveis causas para o desenvolvimento de tumor no sítio da vacina	53
Figura 16. A vacinação com células tratadas pela combinação p19Arf e IFN β mantém a proteção antitumoral mesmo 70 dias após a vacinação	56
Figura 17. Proteção antitumoral induzida pela vacinação com células tratadas só por IFN β ou pela combinação p19Arf e IFN β	60
Figura 18. Ativação de genes alvos de p53 na presença de p19Arf	62
Figura 19. Imunossupressão revela influência do sistema imunológico na formação de tumores a partir de células tratadas com IFN β ou com a combinação p19Arf e IFN β	65
Figura 20. Padronização da depleção dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8	68
Figura 21. Padronização da análise dos linfócitos infiltrantes no tumor do desafio...	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descobertas e eventos importantes no campo da oncologia e da imunobiologia tumoral.....	2
Tabela 2. Proteínas que interagem diretamente com Arf.	18
Tabela 3. <i>Primers</i> usados para RT-qPCR	28
Tabela 4. Resultado das titulações biológicas e físicas dos vetores adenovirais.....	32
Tabela 5. Descrição dos grupos no experimento de associação do vetor adenoviral AdPGIFN β IRESp19 e radiação gama.	37
Tabela 6. Resultado do primeiro protocolo de vacinação 17 dias após o desafio.	37
Tabela 7. Descrição dos grupos utilizados no segundo experimento de vacinação..	40
Tabela 8. Resultado do segundo protocolo de vacinação 16 dias após o desafio. ...	40
Tabela 9. Descrição dos grupos utilizados na vacinação profilática com células transduzidas pelo vetor AdPGIFN β IRESp19.	42
Tabela 10. Resultado da vacinação profilática com células transduzidas pelo vetor AdPGIFN β IRESp19.	42
Tabela 11. Descrição do experimento de vacinação com células co-transduzidas pelos vetores AdPGp19 e AdPGIFN β	46
Tabela 12. Descrição dos grupos utilizados na investigação de possíveis causas para o desenvolvimento de tumor no sítio da vacina.	50
Tabela 13. Descrição dos grupos do experimento de investigação da duração da proteção antitumoral conferida pela vacinação e sua relação com a quantidade células usada na imunização.....	55
Tabela 14. Descrição dos grupos usados na investigação do papel da p19Arf e do IFN β na resposta ao desafio tumoral.....	58

RESUMO

Dados recentes do nosso laboratório demonstram que somente a co-transdução, não a tradução individual, com vetores adenovirais portadores de Interferon-beta (IFN β) (citocina imuno modulatória) e p19Arf (parceira funcional da proteína supressora de tumor p53) resulta na morte celular massiva do melanoma murino B16F10. A capacidade desse tratamento combinado de induzir uma resposta imune antitumoral ainda não foi avaliada. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi investigar se células B16F0 tratadas por essa combinação são capazes de induzir uma resposta imune antitumoral em um modelo de vacinação profilático de melanoma. Para isso, essas células foram co-transduzidas com os vetores AdPGp19 e AdPGIFN β e 48 horas depois, inoculadas como agente vacinal no flanco esquerdo (sítio da vacina) de camundongos C57BL/6 imunocompetentes. Sete dias após a última vacinação, esses animais foram desafiados com células B16F10 *naïve* no flanco direito (sítio do desafio). A progressão tumoral do desafio foi significativamente reduzida, mesmo quando o desafio tumoral foi feito 73 dias após da vacinação. Porém, como os animais imunizados desenvolveram tumores no sítio da vacina, condições para o uso dessas células tratadas foram avaliadas, revelando que: o número de células e de aplicações usadas durante a vacinação tem influência no aparecimento desse tumores, e que apenas com o tratamento combinado os camundongos permanecem livres de tumor. A influência do sistema imune para este resultado foi revelada após protocolo de imunossupressão. Em seguida, o papel da p19Arf e do IFN β na proteção antitumoral da combinação foi estudado. *In vitro*, os efeitos antitumorais da combinação parecem ser mais influentes da reposição de p19Arf do que da expressão de IFN β , mas já *in vivo*, na presença do sistema imune, foram mais dependentes do IFN β . Com a combinação estes efeitos mostraram-se mais pronunciados, induzindo uma proteção antitumoral e maior sobrevida aos animais vacinados. Estes resultados indicam que a combinação p19Arf e IFN β pode ser aplicada como um agente imunoterápico e sugerem que a associação entre morte celular e imuno estimulação pode beneficiar o tratamento contra o câncer.

Descritores: Melanoma experimental; Neoplasias; Vacinas anticâncer; Interferon tipo I; Proteína supressora de tumor p53; Morte celular; Camundongos endogâmicos C57BL.

ABSTRACT

Previously, we have shown in a mouse melanoma model of *in situ* gene therapy that co-transduction, but not individual application, with adenovirus vectors expressing the Interferon-beta (IFN β) (immune modulatory cytokine) and p19Arf (functional partner of the p53 tumor suppressor) transgenes results in massive cell death and reduced tumor progression. However, the capability of this combined treatment to stimulate an antitumor immune response has not been evaluated. Therefore, the aim of this work was to investigate, through a prophylactic vaccine model, if B16F10 cells treated by the p19Arf and IFN β combination could induce such immune response. To do so, these cells were co-transduced by the AdPGp19 e AdPGIFN β adenoviral vectors and 48 hours after, inoculated as a vaccine agent in the left flank (vaccine site) of immune competent C57BL/6 mice. Seven days after the last vaccine, a tumor challenge was done with *naïve* B16F10 cells in the right flank (challenge site). Tumor progression was markedly reduced, even when challenge was done 73 days after the vaccination. However, since these animals developed tumors where the vaccine was applied, more appropriate conditions for the use of these treated cells were pursued, thus revealing that: the number of cells and inoculations can dictate tumor development, and also, that only with the combined treatment was tumor formation abolished. The influence of the immune system for this result was revealed by performing an immune suppression protocol. Next, the roles of p19Arf and of IFN β were studied. *In vitro*, the antitumor effects were stronger upon the introduction of p19Arf than IFN β , but *in vivo*, in the presence of the immune system, the effects were more IFN β dependent. In fact, these effects were more pronounced with the combined treatment, inducing protection against tumor formation and progression and increasing survival in the vaccinated animals. Taken together, these results demonstrate the application of cells treated by the p19Arf e IFN β combination as an effective vaccine agent and also indicates that the association between cell death and immune stimulation may benefit the treatment of cancer.

Key words: Experimental melanoma; Neoplasms; Cancer vaccines; Interferon type I; Tumor suppressor protein p53; Cell death; Mice inbred C57BL.

INTRODUÇÃO

O câncer e outras doenças crônicas não transmissíveis vêm se tornando cada vez mais comuns. Nas últimas décadas, a doença câncer estabeleceu-se como um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde estimou para o ano de 2030, 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes por câncer e que 75 milhões de pessoas viverão, anualmente, com câncer (1).

No Brasil, nota-se que as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias. As estimativas para o ano de 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518 mil novos casos de câncer, sendo que os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino (2).

Durante os últimos dois séculos, entre os experimentos e estudos feitos com a finalidade de compreender o câncer destacam-se as observações de Virshov em 1858, que deduziu a origem celular da doença, e a de Stephen Paget¹ em 1889 que hipotetizou a teoria *seed and soil*¹ sobre o desenvolvimento de metástases. Outros avanços foram a proposta de Theodor Boveri em 1914 que o câncer pode ser resultante de mutações cromossômicas e em 1979 a constatação que determinados genes virais seriam suficientes para imortalizar e transformar células de mamíferos (3). Entretanto, é possível indagar que a descoberta de que oncogenes² virais possuem homólogos intimamente relacionados no genoma humano (proto-oncogenes³) e de outros genes associados com a supressão tumoral e com a instabilidade genética, ajudou a consolidar a talvez simplista noção de que o câncer constitui apenas uma doença genética (4) (**Tabela 1**).

---

¹ A hipótese *seed and soil* de Paget. Ao analisar 735 casos de câncer de mama, ele observou que as metástases se formavam mais no fígado do que em qualquer outro órgão, mesmo em comparação com outros órgãos que, teoricamente, eram igualmente expostos as células tumorais por receberem o mesmo volume sanguíneo. Dessa forma, hipotetizou ao contrário do que se pensava na época, que as células metastáticas (*seed*-sementes) poderiam crescer em qualquer tecido (*soil*-solo) desde que este fosse propício para tal. Assim, os sítios de crescimentos secundários não seriam uma questão de oportunidade, mas sim pelo fato que alguns órgãos proporcionam um ambiente mais "fértil" do que outros para o crescimento de metástases.

² Oncogenes são genes que contribuem com o desenvolvimento de tumores.

³ Os proto-oncogenes são genes responsáveis pelo controle da divisão celular, diferenciação celular e após a sua perda de função ou mutação agem como um oncogene.

Tabela 1. Descobertas e eventos importantes no campo da oncologia e da imunobiologia tumoral.

Ano	Descoberta ou Evento
1863	Origem celular do Câncer (Virshow) Descrição de infiltrado imune em tumores (Virshow)
1889	Hipótese do <i>seed and soil</i> (Paget)
1898	Tratamento de tumores com produtos bacterianos (Coley)
1914	Mutações cromossômicas e Câncer (Boveri)
1937	Fundação do <i>National Cancer Institute</i>
1944	Transmissão da informação celular pelo DNA (Avery)
1950	Avaliação de drogas antitumorais pelo <i>Cancer Chemootherapy National Service Center</i>
1953	Descoberta da estrutura do DNA
1957	Teoria da imuno vigilância (Burnet)
1970	Transcriptase reversa
1971	Enzimas de restrição
1973	Descoberta das células dendríticas (Steinman)
1975	Hibridomas e anticorpos monoclonais
1976	Origem celular dos oncogenes retrovirais
1981	Supressão tumoral pela p53
1983	Primeiro estudo com Interleucina-2
1984	Proteínas G e Sinalização celular
1985	Primeiro estudo com Interferon-alpha em melanoma Primeiro estudo com transferência adotiva de células em câncer
1990	Primeira diminuição na incidência de câncer e sua mortalidade
1994	Associação entre o gene BRCA1 e câncer de mama
2000	Sequenciamento do genoma humano
2002	Influência da epigenética e de microRNAs no Câncer
2005	Primeira redução no número total de mortes por Câncer
2006	Interações entre o tumor e o estroma (microambiente tumoral)
2009	Vacinação de HPV (VIN)
2010	Aprovação do FDA de Sipuleucel-T ® em câncer de próstata
2011	Aprovação do FDA de Ipilumimab ® em melanoma metastático

Adaptado de (3) e (5).

Neste período é possível observar que a maior compreensão dos processos celulares e moleculares do câncer ocorreu juntamente com importantes descobertas científicas (e.g. estrutura do DNA), advento de tecnologias (e.g. enzima de restrição, sequenciamento do DNA) e elucidação de mecanismos biológicos (e.g. p53, proteínas G), acarretando somente em 2005 a primeira redução do número total de mortes por câncer (3).

Mais recentemente, os tumores deixaram de ser vistos como uma massa composta por apenas células cancerosas e começaram a ser considerados como um tecido complexo composto por distintos tipos de células (e.g. células imunes, endoteliais, mielóides, fibroblastos), que participam de interações heterotípicas umas

com as outras. Neste tecido, o recrutamento de células não tumorais como agentes atuantes em vez de simples observadoras tem importantes funções tanto no desenvolvimento quanto na progressão da doença. Dessa forma, o conceito atual da biologia tumoral compreende não somente as interações entre as células tumorais, mas também as interações entre as células tumorais e estromais, que juntas formam o microambiente tumoral (6).

As principais características desse microambiente tumoral são: (1) desregulação de vias energéticas; (2) sinais de proliferação autossustentados; (3) evasão de sinais supressores de crescimento celular; (4) replicação ilimitada; (5) promoção de inflamação; (6) invasão e metástases; (7) indução da angiogênese; (8) instabilidade genômica e desenvolvimento de mutações; (9) resistência à morte celular; (10) evasão dos mecanismos imunes antitumorais (6). O ganho dessas características ocorre através de uma forte seleção positiva durante a tumorigênese e representa o benefício da transformação celular para o câncer, já que as células que não as adquirem, provavelmente, não conseguirão se estabelecer. Porém como a aquisição dessas características ocorre de maneira gradual e progressiva, o tecido tumoral pode demorar anos para progredir e se estabelecer sobre o organismo hospedeiro (7).

Possivelmente, devido ao desconhecimento dessas características e do conceito sobre o microambiente tumoral o tratamento do câncer, no último século, focou em sua grande maioria apenas na erradicação das células tumorais e se restringiu à radiação, cirurgia e quimioterapia. De modo que somente nas últimas décadas, a imunoterapia do câncer foi considerada como estratégia terapêutica interessante (4).

A administração das citocinas³ interleucina-2⁴ e do interferon-alpha, em 1983 e 1985, respectivamente, estimulou muitos estudos sobre a atuação do sistema imune como estratégia terapêutica. De fato, a regressão do melanoma metastático e carcinoma renal observada após a administração dessas citocinas representa um dos primeiros indícios de que o sistema imune pode ser manipulado para o

---

³ Citocinas são moléculas de sinalização secretadas pelas células para se comunicarem. Podem ser classificadas como proteínas, péptidos, ou glicoproteínas.

⁴ Interleucinas são citocinas produzidas na sua maioria por linfócitos T CD4+, bem como através de monócitos, macrófagos e células endoteliais e promovem o desenvolvimento e diferenciação de T, B e células.

tratamento do câncer (8). Atualmente, o sucesso de estratégias como a utilização de agentes imunomodulatórios (e.g. Ipilumimab®), vacinação com células dendríticas (e.g. Sipuleucel-T®) e a manipulação genética de linfócitos (e.g. *T cells with chimeric antigen receptor – CAR T cells*⁵), tem fornecido fortes evidências da atuação do sistema imune na regressão tumoral (5). Além disso, surpreendentemente, novos estudos também apontam que o efeito antitumoral de alguns quimioterápicos bem sucedidos na clínica (e.g. antraciclinas) na verdade, deve-se à capacidade destes em induzir uma resposta imune antitumoral (4).

Dessa forma, o microambiente tumoral é um tecido complexo e pode ser um alvo no desenvolvimento de novas terapias antitumorais. Dentre essas, a imunoterapia do câncer pode ser considerada como uma estratégia terapêutica interessante e promissora. O presente trabalho está inserido neste contexto e tem como objetivo investigar se o tratamento pela combinação p19Arf (proteína supressora de tumor parceira funciona da p53) e interferon-beta (citocina imuno modulatória) é capaz de induzir uma resposta imune antitumoral em um modelo de vacinação profilático de melanoma murino.

---

⁵ *CAR T cells* são células T com receptores artificiais engenheirados para conferir a especificidade de um anticorpo monoclonal a essas células. A codificação da sequência deste receptor é normalmente feita por vetores retrovirais. Deste modo, um grande número de células T específicas para os antígenos tumorais podem ser gerados por transferência de células adotiva.

REVISÃO DA LITERATURA

Compreendendo a relação entre o câncer e o sistema imunológico: a hipótese da imuno edição tumoral

A ideia de que o sistema imune poderia controlar o câncer foi inicialmente proposta por Paul Ehrlich em 1909 e desde então foi alvo de intenso debate científico. Porém, como pouco se sabia sobre os componentes essenciais do sistema imune na época não foi possível comprovar esse conceito. Mais tarde, cerca de 50 anos, Burnet desenvolveu a hipótese da imunovigilância, que propunha que o sistema imune adaptativo era responsável por prevenir o aparecimento de tumores em hospedeiros imunocompetentes. Entretanto, estudos subsequentes não conseguiram comprovar tal função, pois camundongos *Nudes* (imunodeficientes do componente adaptativo, mas não do inato) tinham a mesma susceptibilidade que camundongos imunocompetentes (9).

Somente na década de 1990, utilizando camundongos *knockout*⁶ para os genes IFN-gama (deficiente para a sinalização de IFN do tipo II) ou Rag2^{-/-} (fator de transcrição necessário para o desenvolvimento de células T, B e NK), foi possível observar uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores induzidos por carcinógenos, na ausência de componentes essenciais do sistema adaptativo (9).

A partir dessa observação, foi demonstrado que o sistema imune também pode influenciar na qualidade (imunogenicidade) dos tumores, pois tumores originados em animais imunodeficientes eram mais imunogênicos (classificados como não editados), do que os tumores desenvolvidos em animais imunocompetentes (editados). Ou seja, aparentemente as células tumorais imunogênicas são combatidas pelo sistema imune e eliminadas, porém durante a tumorigênese essa imunogenicidade é perdida e o tumor pode agora fugir do controle imunológico e progredir mesmo na presença desse sistema (10).

Este papel pró e antitumoral exercido pelo sistema imune não era contemplado dentro da vigilância imune, e por isso esse conceito foi reformulado e a

---

⁶ Camundongos *knockout* são animais geneticamente modificados que possuem genes endógenos inativados, ou “nocauteados”. Atráves da perda de função desses genes sua função ou influência em um determinado processo pode ser estudada comparando o fenótipo desse animal com um animal selvagem.

hipótese mais aceita neste campo é a imuno edição tumoral. Sendo esta dividida em três fases contínuas e progressivas: eliminação (primeira), equilíbrio (segunda) e evasão (terceira) (**Figura 1**). Entretanto, devido à influência de fatores externos como condições ambientais, imunodeficiências adquiridas ou envelhecimento, em alguns casos, os tumores podem entrar diretamente na fase de equilíbrio ou evasão, sem passar pela eliminação (11).

Figura 1. Representação esquemática do processo de imuno edição tumoral. A imuno edição tumoral descreve um processo no qual os componentes da imunidade adaptativa e inata interagem com as células tumorais para eliminá-las e impedir o desenvolvimento de tumores (primeira fase, eliminação). Entretanto, devido à instabilidade genética, variantes tumorais menos susceptíveis ao ataque do sistema imune podem aparecer e se manter em um estado de dormência proliferativa devido a um constante combate com o sistema imune (segunda fase, equilíbrio). Essa fase pode se manter muitos anos e pode gerar um repertório celular que é capaz de evadir ou subverter o ataque do sistema imune (terceira fase, evasão). Dessa maneira, o tumor escapa do controle imunológico e pode ser clinicamente detectável. Adaptado de (11).

A fase de eliminação pode ser descrita como uma versão atualizada da hipótese de imuno vigilância, na qual a imunidade inata e adaptativa trabalham em conjunto para eliminar tumores nascentes, muito antes de serem clinicamente detectáveis. Esta eliminação ocorre, possivelmente, através de sinais clássicos de

perigo tais como DAMPS⁷, HSP (*Heat Shock Proteins*) e Interferons do tipo I, que são induzidos durante a fase inicial do desenvolvimento tumoral. Esses sinais ativam células dendríticas e promovem uma resposta mediada por células T efetoras CD4+⁸ e CD8+⁹. Outro possível mecanismo é mediado pela expressão de ligantes da célula NK, como NKG2 e TRAIL. Se este processo é bem sucedido o hospedeiro permanece livre de tumores. Entretanto, se uma variante rara de células tumoral não é eliminada, esta pode proliferar e entrar na fase de equilíbrio (11).

No equilíbrio, o crescimento tumoral é combatido, principalmente, por mecanismos imunes adaptativos. Células T, interleucina 12, IFN β , IFN γ são necessários para manter o tumor em um estado de dormência por mais de 20 anos em humanos. De modo que componentes inatos, como as células NK (*Natural Killer Cell*), aparentemente não desempenham um papel fundamental nesta etapa. A edição tumoral ocorre nesta fase, devido a uma constante pressão seletiva do sistema imune e a instabilidade genética, variantes tumorais menos imunogênicas podem surgir. Entretanto, estas variantes podem não ser mais reconhecidas pelo sistema imune, ficar resistentes aos mecanismos antitumorais, ou, induzir um ambiente altamente imunossupressor e dessa maneira, o tumor foge do controle imunológico entra na fase de evasão e as células emergem para causar a doença em si (11).

O câncer pode escapar do controle imunológico por diversos mecanismos. Entre os principais, no nível das células tumorais, alterações genéticas podem levar a perda de antígenos imunogênicos, resistência aumentada à citotoxicidade mediada por células T e expressão reduzida de proteínas de MHC (Major Histocompatibility Complex) de classe I. O resultado final dessas alterações é a seleção de variantes pouco imunogênicas que podem se tornar invisíveis ao sistema imune. Os tumores também podem escapar também pelo estabelecimento de um ambiente fortemente

---

⁷ *Damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs) são padrões de moléculas associadas perigo que podem iniciar uma resposta imune. Diferentemente dos padrões moleculares associados ao patógenos os DAMPS são componentes nucleolares e citosólicos. Quando libertado para fora da célula desencadeiam uma resposta inflamatória não infecciosa.

⁸ Células T CD4+, ou células T *helper*, desempenham um papel importante no sistema imune, em particular no sistema imune adaptativo. Eles coordenam o tipo da resposta das outras células imunes pela liberação de citocinas como IL-4, IL-12.

⁹ Células T CD8+, também conhecidos como linfócitos T citotóxicos, tem a função de matar células infectadas por vírus, danificadas ou transformadas. Elas podem reconhecer antígenos apresentados por essas células via MHC de classe I pelo seu receptor de células T (TCR). Quando ativadas liberam citotoxinas como granzimas, perforinas e expressam o ligante Fas do receptor de morte.

imunossupressor. Este estado é adquirido pela secreção de citocinas supressoras como, VEGF (*Vascular Endothelial Growth*), TGF β (*Transforming Growth Factor-beta*), IDO (*Idoleamine 2,3-Di-Oxygenase*), interleucina 10 e pelo recrutamento de células, tais como, células T reguladoras e MSDC (*myeloid derived supressor cell*). (10).

Imunoterapia do câncer

A imunoterapia é uma estratégia atraente e promissora para o tratamento do câncer, que visa à ativação de uma resposta imunológica específica para combater as células tumorais (12). Vários grupos de pesquisa buscam o aprimoramento desse sistema para combater tumores já estabelecidos ou para prevenir o seu estabelecimento, e de fato, vários tipos de vacinas contra o câncer se mostram capazes de gerar uma forte resposta imunológica (13).

O principal objetivo é ativar o sistema imune para reconhecer antígenos tumorais, proteínas que são especificamente expressas pela célula tumoral e podem ser apresentadas na membrana celular como antígeno do MHC. Os antígenos tumorais são definidos em dois principais grupos: (1) antígenos específicos tumorais, que são geralmente únicos às células tumorais e resultantes de mutações de genes normais ou da expressão de oncogenes virais e (2) antígenos tumorais associados, que são proteínas humanas normais anormalmente superexpressas nas células tumorais (14).

As vantagens de uma imunoterapia bem sucedida em comparação com os tratamentos convencionais seriam: relativamente poucos efeitos colaterais e estabelecimento de uma memória imunológica, que pode levar a uma imunização prolongada contra recorrência tumoral ou contra o aparecimento de metástases (15).

Nos últimos anos, muitos protocolos clínicos da fase III falharam em alcançar os seus objetivos (13). As principais dificuldades para um tratamento efetivo foram: (1) ambiente imunossupressor tumoral; (2) baixa eficiência das células apresentadoras de antígenos em reconhecer e apresentar os antígenos; (3) inibição da ativação das células T; (4) atuação de células imunossupressoras, citocinas imunossupressoras, perda de antígenos e (5) reduzida expressão de MHC-I e fatores metabólicos inibitórios (16).

Mesmo com esses fatores, a prova de princípio de que o sistema imune poderia ser efetivamente manipulado para o tratamento do câncer foi demonstrada

com os resultados dos protocolos clínicos de fase III dos imunoterápicos Sipuleucel-T® e Ipilumimab®, em 2010 e 2011, respectivamente. Sipuleucel-T representa a primeira vacina aprovada pelo FDA (*USA Food and Drug Administration*) para o tratamento do câncer de próstata refratário à hormônio terapia. A vacina Sipuleucel-T consiste em utilizar células apresentadoras de antígenos autólogas do sangue periférico, ativadas *ex vivo* com proteína de fusão que contem o fator GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) fusionado com a proteína PSPAP (*Prostatic Specific Acid Phosphatase*) específica para o câncer de próstata. Durante o protocolo multicêntrico de fase III, pacientes com câncer de próstata metastático que receberam a Sipuleucel-T tiveram o tempo total de sobrevida prolongado e o risco de morte reduzido. Além disso, os pacientes do grupo Sipuleucel-T que apresentaram altos títulos de anticorpos contra proteína de fusão ou a PSPAP viveram mais dos que apresentaram baixos títulos (17).

Ipilumimab é um anticorpo monoclonal contra o receptor CTLA4 que atua sobre a função de células T, mais especificamente, por diminuir os efeitos imunossupressores sobre essas células. A CTLA4 é expressa em células dendríticas ativadas e regula negativamente a ligação dessas células apresentadoras de antígenos com as células T, impedindo uma ativação exacerbada das células T. Os linfócitos T reguladores também expressam a CTLA4 que utilizam dessa molécula para atenuar uma resposta efetora das células T. Dessa maneira, o Ipilumimab antagoniza a função supressora da CTLA4, permite uma maior ativação das células T e assim induz uma resposta imune antitumoral mais potente (8). Os resultados do protocolo clínico de fase III contra melanoma metastático demonstraram um grande benefício para os pacientes tratados com esse anticorpo. Pois, não apenas a sobrevida foi significativamente aumentada no grupo tratado apenas com esse anticorpo, mas também uma completa remissão da doença foi observada em alguns dos pacientes dois anos e meio após o tratamento (18).

O tipo de resposta depende na plataforma escolhida para sensibilizar o organismo e entre as estratégias mais frequentemente usadas estão: (1) as vacinas de células tumorais autólogas; (2) de células tumorais alogênicas; (3) de lisados tumorais; (4) de células tumorais modificadas geneticamente para expressar citocinas; (5) de células dendríticas e (6) de bactérias geneticamente modificadas. Outras variáveis também incluem a rota de administração (subcutânea,

intramuscular, intradérmica, intravenosa e intralinfática) e o uso de adjuvantes como GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), IL-2 e IFN γ (19).

Vacinas de lisados de células cancerígenas são utilizadas para fornecer um grande número de antígenos tumorais, incluindo tanto os antígenos conhecidos e os desconhecidos, para gerar uma resposta imunológica ampla contra o tumor e seus antígenos (20). Vernon e colaboradores (2003) relataram os resultados de uma vacina humana (Melacine®) construída a partir de lisados tumorais alogênicos e combinada com o adjuvante Detox®. Estudos clínicos de fase I e II em estágio avançado de melanoma apresentaram uma forte atividade antitumoral. Já estudos de fase III indicaram um benefício na sobrevida nos pacientes que expressavam antígenos de MHC-I (21).

Células tumorais que expressam citocinas imuno estimulatórias são desenvolvidas a partir da transdução de genes que codificam estas citocinas e podem assim, aumentar drasticamente a imunogenicidade do tumor sem causar efeitos colaterais (22). Estudos em animais demonstraram que a manipulação *ex vivo* de células de melanoma com uma variedade de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IFN γ) promovem a rejeição das células geneticamente modificadas pelos seus hospedeiros singênicos. Outros trabalhos mostraram que este tipo de vacina é capaz de induzir uma imunidade sistêmica e preventiva, já que os animais vacinados com estas células modificadas rejeitaram vários tumores selvagens (não transduzidas) e até eliminaram um tumor pré-existente (23).

Interferons do tipo I e suas funções antitumorais

A família de proteínas Interferon (IFN) foi originalmente identificada por sua capacidade de “interferir” na replicação viral do vírus influenza, sendo então reconhecida por proteger células contra infecções virais (24). Porém, somente no final da década de 1960 o papel antitumoral dessa família começou a ser estudado. Nestes primeiros estudos, foi observado que camundongos que eram transplantados com tumores singênicos tinham uma sobrevida maior quando esses tumores eram tratados com preparações de Interferons do tipo I (25). Resultados similares também foram observados quando essas proteínas foram superexpressas em diversos tipos de tumores (26). Recentemente, Dunn e colaboradores em 2005 demonstraram que camundongos deficientes para o receptor de IFN ou para a sinalização de IFN (e.g.

STAT 1) são mais susceptíveis para o desenvolvimento de tumores do que os camundongos selvagens (27).

A família IFN incluem duas principais classes de citocinas: tipo I e tipo II. Existem muitos tipos de IFN do tipo I com uma considerável homologia estrutural. Estes incluem o IFN α (que pode ser subdividido em 13 diferentes subtipos), IFN β , IFN δ , IFN ϵ , IFN κ , IFN τ e IFN ω . Os IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ e IFN ω são encontrados em humanos e camundongos, já o IFN δ e IFN τ somente foram descritos em suínos e bovinos, respectivamente, não tendo homólogos em humanos. Estes genes são localizados no cromossomo 9 em humanos, no 4 em camundongos e são expressos em quase todas as células nucleadas. Surpreendentemente, todos esses IFN se ligam ao mesmo receptor de superfície celular, conhecido como receptor de IFN do tipo I (IFNAR1) (28).

Em contraste existe apenas um IFN do tipo II, o IFN γ . O seu gene está localizado no cromossomo 12 em humanos, no 10 em camundongos e sua proteína não possui uma homologia estrutural com os IFN do tipo I, sendo expresso em linfócitos T, células NK e NKT em resposta a antígenos específicos, ligantes de NK e de TLR (*Toll Like Receptors*). O IFN- γ também se liga a um diferente receptor conhecido como receptor de IFN do tipo II (IFNARII). Recentemente, um nova classe de IFN ou IFN-*like* foi relatada como IFN- λ , IFN λ_2 e IFN λ_3 , que também são conhecidos como IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente. Essas citocinas também possuem atividades antivirais, mas distintas dos IFN I e II e se ligam a um diferente receptor, o IFNLR1 (28).

O receptor do IFN do tipo I é composto por duas distintas subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, no qual cada uma dessas subunidades interage com um membro da família JAK (*Janus Activated Kinases*). A subunidade IFNAR1 é constantemente associada com a TYK2 (*Tyrosine Kinase 2*), a outra subunidade é associada com a JAK1. Através de um rearranjo provocado pela interação com o ligante, essas subunidades JAK se associam formando um receptor dímero, que em seguida se auto-fosforila, ativando suas JAKs associadas (28). Assim, na via canônica, a ativação dessas JAKs causa fosforilações tirosina sitio-específicas nas proteínas STAT1 e STAT2 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 1 and 2*), que uma vez fosforiladas se combinam com o fator IRF-9 (*Interferon Regulatory Factor 9*) para formar o complexo transcricional heterotrimérico ISGF3 (*Interferon-*

Stimulated Gene Factor 3), responsável por ativar os genes induzidos por IFN. As regiões promotoras desses genes contêm o elemento ISRE (*Interferon Stimulated Response Element*). Adicionalmente, o Stat 1 fosforilado também sofre homodimerização e é então, convertido na sua forma ativa que se liga à região promotora de genes com sítios ativados por IFN- γ (**Figura 2**) (29).

Figura 2. Vias de sinalização ativadas pelos Interferons do tipo I e II. O receptor do IFN do tipo I é composto por duas distintas subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, que interagem com membros da família JAK. Após a interação com o IFN do tipo I essas subunidades se rearranjam formando um receptor dímero, que em seguida se auto-fosforilam, ativando suas JAKs associadas. A ativação dessas *Janus kinases* fosforilam as proteínas STAT1 e STAT2, que uma vez fosforiladas se combinam com o fator IRF-9 para formar o complexo transcricional heterotrimérico, responsável por ativar os genes induzidos por IFN. As regiões promotoras desses genes contêm o elemento ISRE. Adicionalmente, o STAT 1 fosforilado também sofre homodimerização e é então, convertido na sua forma ativa que se liga à região promotora de genes com sítios ativados por IFN- γ . Adaptado de (28).

Dessa maneira, os IFN α/β podem induzir a expressão de mais de 300 genes (30). Porém, a sinalização clássica por JAK-STAT sozinha não é capaz de explicar todo o repertório de respostas induzidas pelos IFNs. Em adição aos genes induzidos pelo complexo transcricional formado pelo IRF9, o envolvimento de outros IRFs¹⁰ (e.g. IRF3, IRF5, IRF7) pode ativar ou reprimir diferentes genes (31). Além disso, outras vias de sinalização podem ser ativadas sem a participação desses fatores de transcrição, como por exemplo, a sinalização por MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) e da PI3K (32). O tipo de célula que produz e recebe o IFN, o tempo de produção e o microambiente inflamatório também pode influenciar na resposta (33). Por fim, a diferença de afinidade dos IFNs com o receptor também poderia explicar os distintos efeitos ativados, como demonstrado pelo IFN- α que apresenta uma baixa afinidade para o IFNRA1 enquanto o IFN β apresenta uma afinidade 20 vezes mais elevada (34).

Os IFN do tipo I podem modular as fases do ciclo mitótico e afetar diretamente a proliferação celular. Este efeito citostático ocorre principalmente pela diminuição das atividades ou da expressão de uma série de serina/treonina quinases, ciclinas e CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*) que controlam a passagem pelas diferentes fases do ciclo celular (35). A redução global nas atividades dessas ciclinas e CDKs (e.g. cdk4, cdk6, ciclina A) resulta na diminuição da fosforilação da pRB¹¹, evitando assim a progressão do ciclo celular, em um bloqueio de G1 ou em um alongamento de todas as fases (G1, G2 e S) (36) (37).

Em adição ao controle do ciclo celular, os IFNs também podem induzir morte celular. Estudos de expressão gênica identificaram mais de 15 genes estimulados por IFN com funções pró-apoptóticas, entre eles a TRAIL/Apo2L (*TNF- α Related Apoptosis Inducing Ligand*), Fas/FasL, XAF-1 (*XIAP Associated Factor 1*), caspase-4, caspase-8, PKR (*dsRNA activated protein kinase*), OAS (*2'5'A Oligo-Adenylate Synthetase*), DAP-K (*Death Activating Protein Kinases*), *phospholipid scramblase*, galectin 9, gene PML (*Pro-Myelocytic Leukemia*) e os RIDs (*Regulators of IFN*

¹⁰ *Interferon Regulatory Factors* (IRFs) estão envolvidos na imunidade contra vírus, agentes patogênicos, diferenciação celular, apoptose, e na supressão tumoral. Existem nove membros da família IRF em humanos e camundongos: IRF-1, IRF-2, o IRF-3, IRF-4, IRF-5, IRF-6, IRF-7, IRF-8, e IRF-9. Quatro desses IRFs (IRF-1, IRF-3, IRF-5, e IRF-7) foram consideradas feedback positivo de regulação. Contudo, apenas três deles, IRF-3, IRF-5, e IRF-7, podem funcionar como reguladores diretos da sinalização e desempenham um papel crucial na expressão do IFN tipo I.

¹¹ A proteína do retinoblastoma (pRb) é uma proteína supressora de tumor que tem por função impedir o crescimento excessivo de células por inibição da progressão do ciclo celular, até que a célula esteja pronta para se dividir.

aumentar a atividade citolítica dessa célula e das células NK, também pode aprimorar as células imunes vizinhas para secretar um repertório de citocinas pró-inflamatórias importantes na diferenciação de células imune-efetoras (38). No entanto, as células dendríticas podem ser as maiores produtoras de IFN, fato que destaca o importante papel do IFN na indução de uma resposta imune adaptativa (33). O IFN produzido por essas células aumenta os níveis de moléculas de MHC-I, os sinais co-estimulatórios e induz a maturação e ativação dessas células. Adicionalmente, o IFN também pode favorecer a apresentação cruzada de antígenos, elevar a atividade citotóxica de células T CD8+ e direcionar uma resposta CD4+ do tipo TH1 (39). Por fim, nas células B o IFN pode aumentar a sobrevivência, produção de anticorpos, troca de classe e geração de células B de memória (40) (41).

A proteína supressora de tumor p19Arf

A proteína Arf (conhecida como p14Arf em humanos e p19Arf em camundongos) foi originalmente identificada como um transcrito alternativo do *locus* INK4b-Arf-INK4a localizado no cromossomo humano 9p21.1 (42). Notavelmente, devido a diferentes matrizes de leitura (*alternate reading frame*) esse mesmo *locus* codifica duas proteínas supressoras de tumor da família CDKI (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*), a p15INK4b e p16INK4a, e a proteína Arf (**Figura 4**). Porém, é importante ressaltar que a INK4 e Arf possuem diferentes primeiros exons, não são consideradas isoformas, não possuem homologia de aminoácidos e por terem promotores separados, podem ser independentemente reguladas, mutadas ou silenciadas (43).

Figura 4. Representação esquemática do locus INK4b-Arf-INK4a. Este locus possui três genes supressores de tumor em proximidade um dos outros. Os exons estão representados em retângulos coloridos (E) e os promotores indicados por setas. Ambos a INK4b e a INK4a codificam inibidores (p16INK4b e p15aINK4a) das ciclinas dependentes de quinases (CdK4 e CdK6). Estes dois genes falqueiam o exon 1β do gene Arf. O RNA codificado sofre splicing (linhas pretas) com os exons 2 e 3 da INK4a. O codon iniciador da Arf é lido por uma matriz de leitura alternativa da INK4a (44).

As funções de supressor de tumor das proteínas p16INK4a e Arf são observadas pela maior susceptibilidade de camundongos deficientes em Arf/INK4a em desenvolver tumores. Porém, camundongos *knockout* somente para Arf desenvolvem tumores no início da vida, já para a p16INK4a não apresentam tal predisposição com menos de 17 meses. Indicando um papel predominante de Arf já que o fenótipo observado pela deleção de ambos p16INK4a e p19Arf pode ser comparável com a deleção de apenas Arf (45).

Estudos com fibroblastos embrionários de camundongos derivados de linhagens *knockout* para Arf e INK4a também enfatizam um papel independente de Arf. Nos fibroblastos selvagens, a Arf e a INK4a se acumulam com as passagens e são capazes de fugir da senescência induzida por essas múltiplas passagens pela deleção do eixo p53/Arf, ao em vez do INK4a-Rb. Apesar dessas observações não se aplicarem em todos os tipos celulares, elas apontam uma maior importância da supressão tumoral da proteína Arf do que da INK4a (46).

A função mais bem definida de Arf é suprimir a proliferação celular aberrante em resposta à ativação oncogênica (e.g. Myc, E2F1 e Ras) pela ativação do fator de transcrição p53 (43). A proteína p53 em resposta a diferentes tipos de estresse pode direcionar a célula para apoptose, parada do ciclo celular, senescência, reparo do DNA ou autofagia (47). Em condições de homeostasia o nível desta proteína é relativamente baixo devidos aos efeitos inibitórios de duas ubiquitinas ligases¹² específicas para p53, Mdm2 e Arf-BP1/MULE (*Arf-binding protein1/Mcl1-Ubiquitin Ligase E3*) (44). No entanto, quando a célula sofre algum tipo de estresse com potencial de transformação, ocorre um aumento da sua expressão e atividade. Para isso a proteína Arf se liga diretamente com Mdm2 ou realocaliza Mdm2 no nucléolo e assim bloqueia a ubiquitinação mediada pela Mdm2 (**Figura 5**) (48).

---

¹² A ubiquitina ligase é uma proteína que faz a ligação de uma ubiquitina com uma lisina da uma proteína-alvo para direcionar substratos proteicos ou proteínas para a degradação do proteossoma.

Figura 5. Representação esquemática da via Arf-Mdm2-p53. A ativação de oncogenes tais como MYC e Ras induzem a expressão de Arf. Uma vez expresso, a Arf interage com Mdm2, estabilizando p53 para que possa atuar como fator de transcrição de seus genes alvos. Mdm2 não é apenas o regulador negativo de p53, mas também é um alvo transcrional de p53, estabelecendo um tipo de *feed-back* negativo, já que quanto mais p53 for expresso mais Mdm2 será expresso para controlar os níveis de p53. A ativação de p53 ocorre classicamente em resposta a diversos tipos de estresse como radiação gama, hipóxia, raio x. Dependendo da natureza do estresse as proteínas ATM/ATR podem ser ativadas e fosforilar p53 diretamente ou indiretamente pelas quinases CHK1 e CHK2. Apesar de Arf não ser tipicamente ativado pelo dano no DNA, sua inibição de Mdm2 pode modular a resposta de p53 frente ao dano no DNA. Adicionalmente, a ativação de ARF pelo estresse oncogênico induz primariamente uma parada no ciclo celular, porém se o dano ou estresse for muito colateral para a célula a resposta pode mudar para apoptose (44).

Tendo em vista o mecanismo de regulação p53/Mdm2/Arf, pode-se deduzir que esta via ocupa uma posição central nos sistemas de controle do ciclo celular e de indução de apoptose, e ainda que falhas nesta via podem ser responsáveis pela gênese de tumores. Esta dedução é suportada pelos seguintes dados: (1) falhas em p53 estão presentes em 50 a 60% dos cânceres humanos; (2) o gene Mdm2 está amplificado em 30 a 40% dos sarcomas, sendo que na maioria destes tumores p53 se apresenta selvagem (49) (3) a maioria dos tumores com p14Arf mutado apresenta p53 tipo selvagem (50) (51).

A principal característica estrutural da proteína Arf é sua composição com mais de 20% de resíduos de arginina com muito pouco ou quase nenhuma lisina. Os resíduos de arginina estão localizados por toda a molécula e os segmentos codificados pelos exons 1 β e exon 2 são igualmente básicos. Dessa forma em condições fisiológicas, a Arf provavelmente não consegue se estruturar sozinha e precisa formar complexos com outras moléculas para adquirir uma terciária e para que sua carga básica seja neutralizada pelo pH fisiológico. É interessante apontar

que com um ponto isoelétrico de 12, a Arf pode se ligar de maneira “promiscua” a muitas moléculas (descritas na **Tabela 2**), sendo que destas pelo menos mais de 25 proteínas podem estar associadas com suas funções independentes de p53 (44).

Tabela 2. Proteínas que interagem diretamente com Arf.

Proteína	Função
ANCO1	Liga-se à deacetilases de histonas e inibe a transcrição
ATR e ATM	Proteína quinase ativadas pelo dano ao DNA
Bcl6	Repressor transcricional: uma oncoproteína em células B e um inibidor da senescência induzida por Arf
CTB1	<i>C-Terminal Binding Protein</i> ; um co-repressor anti-apoptótico que é desestabilizado por Arf
<i>Cyclin G1</i>	Gene induzido por p53 para recrutar a PP2A que desfosforila a MDM2
E2F1 e DP1	Fatores de transcrição necessárias para a replicação do DNA
FOXM1B	Fator de transcrição da família forkhead box (Fox)
GSPT1	Proteína ligante de GTO necessária para a transição G1-S
HIF1 α	Fator de transcrição induzido por hipóxia
HPV16	Oncoproteína E7 <i>Human Papilloma Virus</i> que antagoniza a função da proteína retinoblastoma
LZAP	Antagoniza a inibição de Arf sobre da E3 ligase Mdm2, mas mesmo assim estabiliza p53
Mdm2	Uma E3 ubiquitina ligase de p53
MYC	Fator de transcrição capaz de transativar e reprimir muitos genes
NIAM	Promove a interação nuclear de Arf e Mdm2
<i>Nucleolin</i>	Proteína nucléolo com função na biogênese de ribossomos
<i>Nucleophosmin</i>	Proteína de fosforilação nucleolar implicada na biogênese de ribossomos, duplicação dos centrômeros e na resposta ao dano no DNA
TP53	Fator de transcrição ativado por múltiplos sinais de estresse celular

Adaptada de (44).

Normalmente a Arf reside dentro nucléolo aonde pode se ligar à NPM (*Nucleolar Phosphoprotein B23/nucleophosmin*) e atenuar a transcrição e o processamento do RNA ribossomal (52). A NPM é uma proteína abundante no núcleo envolvida na biogênese dos ribossomos, na qual seus níveis de expressão se correlacionam diretamente com o estado proliferativo da célula. Contudo, na resposta ao estresse ontogênico a Arf entra no nucléolo e forma um complexo com a NPM, exercendo funções inibidoras de crescimento celular (53).

A resposta antitumoral induzida por Arf é complexa de modo que o papel exato desta proteína ainda não está elucidado. Em células nulas para p53, já foi mostrado que Arf pode induzir uma parada em G1, S ou iniciar apoptose em

resposta à ativação dos oncogenes Myc e E2F1, sem interagir diretamente com o sítio de ligação do DNA desses oncogenes (53). Arf também pode participar da resposta ao dano de DNA pelas vias ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) ou das ATR quinases (*Ataxia Telangiectasia and Rad-3-related*) (54). Além disso, a transcrição de Arf pode ser iniciada no resíduo de metionina e codificar uma proteína de menor tamanho denominada smArf (*Small Mithochondrial Arf*) que por sua vez pode se ligar a membrana mitocondrial, alterar seu potencial transmembranico e induzir morte celular e ou autofagia (55). Recentemente, também foi relatado que a Arf completamente transcrita pode induzir autofagia de uma maneira p53 dependente e p53 independente, sugerindo que a autofagia é outro mecanismo efetor induzido por Arf (56).

Desenvolvimento do promotor PG responsivo à p53

A p53 age como indutor de transcrição se ligando diretamente no promotor de seus genes alvos. Um dos primeiros elementos responsivos à p53 identificados foi isolado do RGC (*Ribossomal Gene Cluster*) (57). Na sequência repórter PG13-CAT, 13 cópias do elemento PG (derivado do RGC) foram unidas a um promotor mínimo e ao cDNA da cloranfenicol acetil transferase, resultando uma unidade regulatória muito sensível à p53 (58). A sequência geral reconhecida pela p53, PuPuPuCA/TA/TGPIPiPi (onde Pu=purina e Pi=pirimidina) foi definida logo depois (58) (59) e está presente no promotor de todos os genes ativados por p53.

Geralmente, a transferência do gene p53 requer a utilização de um vetor viral que serve como veículo para introduzir p53 e fornecer sequências regulatórias capazes de controlar a expressão de p53 dentro da célula tumoral alvo. Tradicionalmente, a atividade do transgene e do sistema que controla sua expressão são considerados independentemente. Por exemplo, um promotor como CMV (*Cito Megalo Virus*) pode dirigir a expressão constitutiva de p53, mas não influenciar a capacidade de p53 para agir como supressor de tumor. Por sua vez, a atividade de p53 não tem impacto significativo no desempenho do promotor CMV. Em contraste com esta visão clássica, um novo conceito no campo de transferência gênica que unifica a atividade do transgene e atividade do promotor gênico foi criado pelo nosso laboratório. Essa estratégia depende da escolha de um promotor que seja controlado pelo próprio transgene, estabelecendo um sistema de autoregulação,

onde a expressssão do transgene induz a atividade do promotor e este último, por sua vez, aumenta a expressão do transgene (60).

Dessa forma, o conceito original consistia de um vetor retroviral chamado pCLPG, onde o promotor viral foi modificado com a inserção do elemento PG, responsivo a p53. Nos vetores do sistema pCLPG a expressão do transgene de interesse é dirigida por p53. Os dados obtidos com este sistema mostraram que o vetor pCLPG atinge um nível de expressão sete vezes maior do que o obtido com o vetor parental pCL (61). Também se observou que quando p53 é codificada pelo próprio vetor pCLPG, o efeito de inibição da proliferação de células tumorais é superior ao efeito visto com o vetor parental (60, 61). Em resumo, os vírus de configuração pCLPGp53 possuem nível de expressão e efeito funcional superiores aos vírus parentais pCLp53 e que este arranjo emprega p53 para executar com sucesso duas funções interligadas: (1) dirigir expressão viral e (2) agir como supressor de tumor.

Os vetores derivados de adenovírus oferecem título alto (em torno de 10^{12} partículas virais/mL) o que facilita a introdução do transgene em grande número de células e viabiliza ensaios *in situ* de terapia gênica. Por este motivo, o conceito dos vetores retrovirais pCLPG foi transferido para os vetores adenovirais, estabelecendo o sistema denominado AdPG, onde a expressão do transgene também é controlada por p53. Dados obtidos com o gene *reporter* luciferase mostraram que na presença de p53, o sistema AdPG induz 600 vezes mais a atividade da luciferase do que na ausência de p53 (62).

OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho é investigar se células B16F10 tratadas com a combinação p19Arf e IFN β são capazes de induzir uma resposta imune antitumoral em um modelo de vacinação profilática para melanoma murino.

Objetivos específicos:

1. Produzir e caracterizar preparações dos adenovírus AdPGLUC, AdPGp19, AdPGIFN β e AdPGIFN β IRESp19.

2. Padronizar a dose de irradiação das células B16.

2.a. Estudar a resposta dos vetores AdPG à p53 após irradiação.

2.b. Analisar a viabilidade e a tumorigenicidade das células B16 após a irradiação.

3. Desenvolver um modelo de vacinação profilática para melanoma murino.

O protocolo de imunização será padronizado variando a frequência de vacina, a via de administração e a quantidade de células necessárias para induzir a imunização, sendo estas irradiadas e ou tratadas com a combinação p19Arf e IFN β .

4. Estudar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na possível resposta imune antitumoral.

4a. Investigar de qual tratamento a resposta imune é mais dependente, vacinando os animais com células transduzidas somente com os vetores AdPGp19 ou AdPGIFN β e comparar o resultado com o da combinação destes.

4b. Depleção de Linfócitos T *Helper* e T Citotóxico durante a fase efetora da resposta imune.

JUSTIFICATIVA

Previamente nosso laboratório demonstrou que a transdução de células B16F10 com os vetores adenovirais AdPGINF β ou AdPGp19 *in vitro* não provoca alterações significantes no ciclo celular. Em contraste, a co-transdução com estes dois vetores resulta em morte celular massiva. Ensaio *in vivo* também confirmaram esta observação. Tumores de B16F10 formados em camundongo C57Bl/6 foram tratados *in situ* com o vetor AdPGp19 e não foi observado a inibição da progressão tumoral. Já o tratamento com apenas AdPGINF β ou com ambos (AdPGINF β e AdPGp19) resultou em redução significativa do volume e progressão tumoral. Porém somente com o tratamento combinado foi observado um aumento da sobrevivência e uma maior marcação de morte celular (63). Estes dados apontam que o tratamento combinado parece ser mais eficiente do que o tratamento com IFN β sozinho, mas não indicam se houve uma participação do sistema imunológico. Dessa maneira, com esse trabalho, pretende-se investigar os possíveis benefícios da combinação p19Arf e IFN β em induzir uma resposta imune antitumoral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção das linhagens celulares

A linhagem transformada por adenovírus HEK293A (*Human Embryonic Kidney*) foi cultivada em meio DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco-BRL®) suplementado com 10% de BCS - *Bovine Calf Serum* (Hyclone®), 50 µg/mL de gentamicina, 25 µg/mL de ampicilina e 2,5 µg/mL de fungizona (anfotericina B), mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

A linha murina de melanoma B16F10 (ATCC CRL-6475) foi transduzida com um retrovírus contendo o CARΔ1 (*Coxsackie Adenovirus Receptor*) e um gene de resistência à neomicina (gentilmente fornecido por James Degregori, *Department of Biochemistry and Molecular Genetics*, University of Colorado, EUA) e após 12 dias de seleção com G418 (500 µg/ml) foi estabelecida a linhagem B16mCAR. Esta modificação foi necessária, pois a transdução de células B16 com vetores adenovirais do sorotipo 5 é ineficiente devido à falta do receptor de adenovírus murino CAR (*Coxsackie Adenovirus Receptor*) porém após a modificação a linhagem passa a ser eficientemente transduzidas. Esta linhagem foi cultivada como descrito acima, porém utilizando meio RPMI (Invitrogen®) e para simplificar será denominada como B16F10.

Produção, purificação e titulação adenoviral

Placas de cultura de 6 cm foram semeadas com $7,5 \times 10^5$ células HEK293A 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 7,0 (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 aderidas e essas então foram incubadas por 4 horas. Em seguida, as células foram submetidas a um choque de glicerol, o qual consiste em tratá-las com PBS contendo 15% de glicerol durante 3 minutos, e após lavá-las com PBS, sendo que, em seguida, adicionou-se meio DMEM com 5% (v/v) de BCS às células. Após 7 dias, a coleta inicial de vírus foi realizada utilizando o método de

congela-descongela, no qual as células e o sobrenadante da placa foram coletadas e passadas para um tubo e submetidas a ciclos de congelamento em gelo seco seguido por banho a 37 °C, por três vezes consecutivas. Após esse processo a amostra foi centrifugada (3220 x g, 5 min, 4 °C), o sobrenadante coletado, aliquotado e armazenado a -80 °C.

A 1ª amplificação viral foi feita através da transdução com as alíquotas contendo vírus em placas de 3,5 cm previamente semeada com 5×10^5 células/placa (HEK293A). As células permaneceram em cultura por aproximadamente 5 dias para que, após, os vírus fossem coletados através do método de congela-descongela. Esse processo foi repetido em placa 6 cm contendo $7,5 \times 10^5$ células HEK293A (2ª amplificação) e depois passado para placas de 10 cm contendo 10^6 células (3ª amplificação) até que foi observado o efeito citopático. Esta foi usada como inóculo para 25 placas 15 cm previamente semeadas com HEK293A e mantidas até o aparecimento do efeito citopático e posterior coleta do lisado celular. Essa solução contendo o vírus foi purificada em gradiente de cloreto de cério.

A titulação física foi realizada diluindo 50 µL do vírus purificado em 450 µL de solução de PBS 0,1% (v/v) de SDS e fazendo a leitura da absorbância a 260 nm. Pelo método biológico foram seguidas as recomendações do fabricante do *Adeno-X Rapid Titer kit* (Cloneteck®).

Através da titulação física são inferidas tanto as partículas virais defectivas quanto as funcionais e pela titulação biológica somente as funcionais, capazes de infectar células. Dessa forma a partir da razão entre os títulos (físico/biológico) a qualidade da produção pode ser inferida.

Construção dos vetores AdPG

O cDNA para o p19Arf ou IFNβ murino foi posicionado sob o comando do promotor sintético PGTxβ (responsivo à p53) (62) para simplificar será denominada como PG, e inseridos no vetor adenoviral do sorotipo 5. Esta nova construção foi desenvolvida no Laboratório de Vetores Virais pelo Dr. Christian Merkel (63).

Citometria de fluxo para detecção da expressão de eGFP

As células modificadas B16pCLeGFP (promotor constitutivo, não responsivo a p53) e B16Δ-eGFP (promotor PG, responsivo a p53) foram semeadas (3×10^5 células por poço em placa de 6 poços) logo após serem irradiadas com radiação gama

seguindo o protocolo descrito a seguir. Posteriormente, as células foram tripsinizadas, fixadas com paraformaldeído 4% (v/v), transferidas para tubos de FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*), analisadas por citometria de fluxo em citômetro FACScalibur (*BD Bioscience*®) e pelo software *CellQuest*.

Irradiação gama sobre a célula B16F10

Células B16F10 (5×10^5) foram transferidas para tubo *falcon* estéril de 15 mL, contendo 5 mL de meio e irradiadas sob uma fonte de ^{137}Cs com o ciclo de 50 Gy (dose mínima emitida) e 100 Gy. Após irradiação, foi removido o meio de cultura e as células mantidas novamente em cultura, até o momento da coleta para os ensaios de ciclo celular ou de eGFP.

Coloração com DilC₁₈

A coloração com DilC₁₈ (Invitrogen) foi feita a partir de 5 mL da solução de uso (5 μM). Retiraram-se as células de uma placa confluenta de 10 cm todo o meio de cultura e lavou-se a placa uma vez com PB. Após, adicionou-se lentamente na placa 5 mL da solução de uso de DilC₁₈ e manteve-se a placa em cultura por 30 minutos. Nesse passo, as células se desprenderam da placa e foram coletadas juntamente com as células que permaneceram aderidas. Após a coleta, transferiu-se a solução para um tubo falcon de 15 mL e lavou-se 2x com PBS, centrifugando a $201 \times g$ por 5 minutos. Em seguida coletou-se do tubo a amostra controle (momento zero), fixando-a com PFA 4% e em paralelo foram semeadas 5×10^5 células em placas de 6 cm. Estas células B16F10, agora coradas, foram submetidas à radiação gama e após 24 horas da radiação fixadas com PFA 4%. Posteriormente as amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

Imunofluorescência para detecção de p19Arf

Células B16F10 foram semeadas (5×10^4 células por poço) em lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços e transduzidas com os vetores AdPGLUC (MOI - *Multiplicity Of Infection* - 1800), AdPGp19 (MOI 900) e AdPGIFN β (MOI 900) AdPGFN β IRESp19 (MOI 3500). Após 48 horas da transdução as células foram preparadas para o ensaio de imunofluorescência.

As células foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), fixadas com metanol 100% e lavadas novamente com PBS. Em seguida, as células foram permeabilizadas com PBS + nonidet p40 0,1% (v/v) por 30 minutos a 37 °C, lavadas

com PBS e para evitar interação não específica do anticorpo foram bloqueadas com PBS + albumina 1% (p/v), por 30 minutos, a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, incubadas com o anticorpo primário policlonal anti-p19, produzido em coelho (Calbiochem®) diluído em PBS + albumina 1% (m/v) por 1 hora a 25 °C, e lavadas novamente com PBS. Posteriormente foram incubação com o anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra conjugado com *Alexa-Fluor 488* (Invitrogen) diluído em PBS por 45 minutos a 25 °C. As células foram lavadas mais uma vez com PBS e incubadas com 20 µg/mL de Hoechst 33258 durante 30 minutos a 25 °C. Após lavagem final com PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas com glicerol 50% (v/v) e seladas com esmalte.

Ensaio de ELISA para detecção de IFN β

Para a detecção da expressão de IFN β pelos vetores virais, o meio no qual as células B16F10 foram cultivadas (48, 72 e 96 horas após a transdução com os vírus AdPGIFN β , AdPGIFN β IRESp19 e AdPGLUC) foram submetidas ao ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Os ensaios foram conduzidos segundo o protocolo do fabricante (PBL Biomedical®) e a absorbância a 450 nm foi determinada no leitor de microplacas Victor (Perkin-Elmer®).

Ensaio de ciclo celular

Células B16F10 ($1,2 \times 10^6$) foram semeadas em placa de 10 cm contendo 2 mL de meio, transduzidas pelos vetores AdPGLUC (MOI 1800), AdPGp19 (MOI 900), AdPGIFN β (MOI 900) e AdPGFN β IRESp19 (MOI 3500) e após 3 horas foi adicionado mais 8 mL de meio à placa. Depois de 24 horas em cultura, as células foram tripsinizadas e divididas em três placas de 6 cm com 3 mL de meio .

As células aderidas na placa, bem como as células que entraram em suspensão pela ação dos vírus foram coletadas (após 48, 72 e 96 horas da transdução) e fixadas em etanol 70% (v/v) até serem analisadas. As células foram centrifugadas a 805xg durante 5 minutos a 4 °C, lavadas com PBS e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células tratadas com 500 µL de PI - *Propidium Iodide* (10 µg/µL) durante 30 minutos a 37 °C. Após este período, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em 100 µL de PBS. O perfil do ciclo celular foi analisado a partir da fluorescência emitida pelo PI medida por citômetria de fluxo.

Marcação com Annexina e PI

O ensaio de marcação com *Annexina V-Alexa 488* (Invitrogen) contra corando com PI foi realizado seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, células B16F10 foram semeadas e transduzidas como descrito acima e após 72 horas, tanto as células aderidas quanto as células no sobrenadante foram coletadas. Em seguida, as células foram transferidas para tubos de FACS, lavadas uma vez com PBS, centrifugando a 201xg durante 5 minutos, ressuspendidas no tampão de ligação de Annexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl, pH 7,4). Adicionou-se a solução 5 µL de Annexina e 1 µL de PI (10 µg/µL), incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente e em seguida, adicionou-se 400 µL do tampão de ligação e analisou-se por citometria de fluxo.

Ensaio clonogênico

Células B16F10 foram transduzidas como descrito acima e após 24 horas a transdução, 500 células foram semeadas em duplicata em placas de 10 cm. Essas placas foram mantidas em cultura por 10 dias com 10 mL de meio foram lavadas com PBS, fixadas solução de ácido acético/metanol (1:7) (v/v) e coradas com cristal violeta por 5 minutos. As colônias foram então contadas, sendo considerado como colônias somente os pontos corados bem formados.

RT-qPCR

Células B16F10 ($1,2 \times 10^6$) foram semeadas em duplicata em placas de 10 cm contendo 2 mL de meio, transduzidas com os vetores AdPGLUC (MOI 1200), AdPGp19, AdPGIFN β ou a combinação (MOI 600 para cada vetor) e após 3 horas foi adicionado 8 mL de meio nas placas. Após 48 horas da transdução, células aderentes foram coletadas com 2 mL de Trizol (Invitrogen). O RNA total foi extraído seguindo instruções do fabricante e a concentração medida pela absorbância a 260 nm. A qualidade do RNA extraído foi verificada pela concentração de proteína e sal, e pela visualização das bandas 18 e 28S do RNA ribossomal em gel de agarose 1% (p/v). Para evitar a contaminação com gDNA as amostras foram tratadas com *RNAse free DNase* (Promega®). Os *Primers* (**Tabela 3**) para RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*) foram desenhados na região codificante mais próxima do terminal 3' do gene usando o software Primer3 Os *primers* foram preferencialmente localizados em exons diferentes (separados por

introns), seguindo as sequências depositadas na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. Para evitar produtos não específicos foi feita a análise “BLAST” na página www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Três genes de referência foram testados (β -actina, 28S e GAPDH), e a β -actina foi selecionada por ser a mais estável entre as amostras. Para os genes Bcl-2 e p53, as variantes 1 e 2 também foram testadas, e as que tiveram maior expressão foram escolhidas. A eficiência dos *primers* desenhados foi avaliada sendo próxima de 100%. RNA Total (2 μ g) foi reversamente-transcrito usando *random primers* e a enzima MMLV reverse-transcriptase (Invitrogen). As condições para as reações foram: 100 ng cDNA (volume final de 20 μ L); 12.5 pmol para cada primer; 10 μ L de Syber Green PCR Master Mix (Invitrogen). A fase de amplificação consistiu de 15 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95 °C, anelamento por 1 minuto a 60 °C e a extensão por 1 minuto a 72 °C. Todas as amostras foram testadas em triplicatas e analisadas pelo 7500 Fast Software 2.05 (Applied Biosystems®). O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi usado para quantificar a expressão dos genes e os dados apresentados em *fold change in expression* (log2) comparadas com células não transduzidas B16F10.

Tabela 3. *Primers* usados para RT-qPCR.

Genes		Primer (5'→3')
Bcl-2 v.1	Forward primer	CTGGTGGACAACATCGCCCTGTG
	Reverse primer	AGGTCGCATGCTGGGGCCATAT
p21 ^{waf}	Forward primer	TGGTGTCTGAGCGGCCTGAAGA
	Reverse primer	TCCCGTGGGCACTTCAGGGT
Mdm2	Forward primer	GGCCTCCAGGCCAATGTGCAA
	Reverse primer	TCGTTTTGCGCTCCAACGGACT
p53 v.1	Forward primer	GACAGCAGGGCTCACTCCAGCTAC
	Reverse primer	GGACGGGATGCAGAGGCAGTCA
PUMA	Forward primer	GAGCGGCGGA. GACAAGAAGAGC
	Reverse primer	AGGATCCCTGGGTAAGGGGAGGAG
p19Arf	Forward primer	GAGCTGCGCTCTGGCTTTCGT
	Reverse primer	TGCCCATCATCATCACCTGGTCCAG

Protocolo de vacinação profilático para melanoma murino B16F10

Neste protocolo de vacinação a própria célula B16F10 tratada pela combinação p19Arf e IFN β é o agente vacinal, responsável por imunizar camundongos imunocompetentes contra um posterior desafio com células B16F10 *naïve*. Deste modo, caso o tratamento combinado fosse capaz de ativar uma

resposta imune antitumoral o tumor do desafio teria seu desenvolvimento afetado por essa resposta.

O protocolo foi dividido em três etapas sequenciais: (1) transdução, (2) vacinação e (3) desafio. Na primeira etapa, células B16F10 foram transduzidas *ex vivo* com os vetores AdPGLUC (MOI 1800), AdPGIFN β (MOI900), AdPGp19 (MOI 900) ou co-transduzidas com os vetores AdPGIFN β e AdPGp19 (MOI 900 para cada um) e mantidas em cultura por 48 horas. Após esse período, na etapa da vacinação, as células transduzidas pelo vetor AdPGLUC foram lisadas por 3 ciclos de congela e descongela e ressuspendias em 100 μ L de PBS. Já as células transduzidas pelos outros vetores foram apenas ressuspendias em 100 μ L de PBS. Logo em seguida essas células (3×10^5) foram inoculadas três vezes, uma vez a cada sete dias, em camundongos imunocompetentes C57Bl/6 no flanco esquerdo via subcutânea (sc), denominado sítio da vacina, e sete dias após a última vacinação, na etapa do desafio, esses animais foram desafiados com 10^5 células B16F10 *naïve*, injetadas no flanco direito (sc), denominado sítio do desafio. O crescimento tumoral nos sítio da vacina e do desafio foi observado a cada três dias e as medidas tumorais aferidas com o auxílio de um paquímetro digital. O cálculo do volume tumoral foi baseado na fórmula proposta por Steel (1977):

$$V = \frac{D \cdot d^2}{2} \quad \begin{array}{l} \text{onde: } V = \text{volume tumoral (mm}^3\text{);} \\ D = \text{maior diâmetro do tumor;} \\ d = \text{menor diâmetro do tumor.} \end{array}$$

Durante a etapa da vacinação e do desafio foram feitas variações no número de células e de aplicações, para facilitar o entendimento das variações estas serão apresentadas na sessão dos resultados.

Produção dos anticorpos monoclonais anti-CEA, anti-CD4 e anti-CD8

Os anticorpos monoclonais foram produzidos a partir dos seguintes hibridomas: UF5H2 (anti-CEA, IgG1 contra um antígeno tumoral humano, controle do isotipo), GK 1.5 (anti-CD4) e 53.6-7(anti-CD8).

Os hibridomas GK 1.5 e 53.6-7 foram mantidos em cultura no Laboratório de Imunologia Molecular do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol) da UNIFESP sob os cuidados do doutorando Jonatan Ersching e do Prof. Dr. Mauricio Martins Rodrigues. Já o hibridoma UF5H2 foi cedido gentilmente pelo doutorando Rodrigo Aguiar e pelo Prof. Dr. Roger Chammas.

Para a produção dos anticorpos, no primeiro dia, camundongos *Nudes* foram injetados intraperitoneal (ip) com 1 mL de Pristane (Sigma®), no dia seguinte, injetados (ip) com 10^5 células e ressuspensas em 200 μ L de meio RPMI. O desenvolvimento da ascite no peritônio foi acompanhado e em torno de 10 dias, quando estava bem desenvolvida, o líquido ascítico foi coletado, em tubos falcon contendo 10 μ L de anticoagulante, perfurando superficialmente a barriga dos camundongos com o auxílio de uma agulha G18. Após isso, o líquido ascítico foi centrifugado a 201xg por 10 minutos, o plasma foi coletado, aliquotado e armazenado a -20 °C.

Depleção e imunofenotipagem dos linfócitos T *Helper* e T Citotóxico

Camundongos C57Bl/6 foram injetados (ip) 3 vezes durante uma semana, uma vez a cada dois dias, com 50 μ L, 100 μ L ou 200 μ L de plasma contendo os anticorpos GK 1.5 (anti-CD4) ou 53.6-7(anti-CD8) e após dois dias o baço e o linfonodo inguinal foram coletados em placas de 6 poços com meio RPMI.

Estes órgãos foram macerados com o auxílio do êmbolo de uma seringa, centrifugados a 201xg por 5 minutos, as hemácias presentes no tecido foram lisadas por choque osmótico durante 2 minutos. Após isso, foram adicionados 10 mL de meio RPMI em cada poço da placa, esta foi centrifugada a 201xg por 5 min e contada 100 milhões de células coradas com *Trypan Blue*. Em seguida essas células foram transferidas para um tubo de FACS, centrifugadas a 201xg por 5 minutos e adicionado em cada tubo 50 μ L de tampão MACS (PBS, BSA e EDTA) e 0,5 μ L dos anticorpos para imunofenotipagem. A solução foi encubada a 4 °C por 20 minutos, posteriormente foi adicionado mais 100 μ L de tampão MACS e em seguida a presença das populações de Linfócitos T *Helper* (CD3⁺CD4⁺) e T Citotóxico (CD3⁺CD8⁺) foi analisadas por citometria de fluxo em citômetro FACS Canto II (BD Bioscience) e pelos *softwares* DIVA e FlowJo. Os anticorpos da imunofenotipagem usados foram: A α CD3 (PE, 17A2, BD Bioscience), A α CD4 (PECy7, RN4.5, Invitrogen) e A α CD8 (APC, 5H10, Invitrogen).

Protocolo de Imunossupressão

Camundongos C57Bl/6 imunocompetentes foram tratados foram injetados no flanco direito (sc) com dexametasona (Roche®) nas dose de 3 ou 10mg/kg/dia ou PBS, como controle, por 19 dias contínuos, sendo as duas últimas aplicações feitas

com intervalo de dois dias. O objetivo de espaçar as duas últimas doses foi prolongar os efeitos imunossupressores e não interromper drasticamente o tratamento. No oitavo dia de tratamento as células B16F10 transduzidas foram inoculadas (sc) no flanco esquerdo e no décimo segundo dia o sangue periférico dos grupos LUC, LUC+3DEX e LUC+10DEX foi colhido via retrorbital em tubos contendo EDTA e enviado para o Laboratório de Controle de Qualidade Genética e Sanitária Animal do Centro de Bioterismo da FMUSP para realização do leucograma diferencial.

Manutenção dos Animais

Os protocolos de vacinação utilizados foram aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP sob o número do projeto 247/10) (**Anexo 1**).

Camundongos C57Bl/6 (fêmeas, com 7 semanas de vida) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP e mantidos durante a fase experimental no biotério do Instituto do Coração da USP. Já os camundongos *Nudes* (machos, com semanas de vidas variadas) foram obtidos do biotério da Faculdade de Veterinária da USP e mantidos no laboratório de Terapia Gênica da Profa. Eugênia Costanzi-Strauss no Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

O bem estar dos animais foi constantemente monitorado, sendo realizada como procedimento de eutanásia em cabine de CO₂ e obedecendo as normas do Centro de Bioterismo da FMUSP para os procedimentos de descarte dos animais.

Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas pelo software *GraphPad Prism 5*. Os testes utilizados em cada experimento estão indicados na legenda de cada figura e os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Produção e caracterização dos vetores adenovirais

Os vetores adenovirais (AdPGLUC, AdPGp19, AdPGIFN β e AdPGIFN β IRESp19) foram produzidos e caracterizados (**Tabela 4**). O número de partículas virais apresentadas para cada célula (MOI) foi calculado a partir da titulação biológica.

Tabela 4. Resultado das titulações biológicas e físicas dos vetores adenovirais.

Vetor	Produção	Titulação biológica (IFU/mL)	Titulação física (Partículas virais/mL)	Física/Biológica
AdPGp19	1	10 ¹¹	3,7x10 ¹²	37
AdPGp19	2	2,6x10 ¹⁰	nd	nd
AdPGIFN β	1	3,2x10 ¹¹	nd	nd
AdPGIFN β IRESp19	1	2,5x10 ¹¹	4,3x10 ¹²	17
AdPGIFN β IRESp19	2	3,5x10 ¹¹	9,1x10 ¹²	26
AdPGIFN β IRESp19	3	2x10 ¹¹	4,6x10 ¹²	23
AdPGLUC	1	2,8x10 ¹¹	4,7x10 ¹²	17

nd - valor não determinado.

A linha murina de melanoma B16F10 foi transduzidas com um retrovírus contendo o CAR Δ 1 (*Coxsackie Adenovirus-Receptor* murino com deleção na porção intracelular) e um gene de resistência à neomicina, após a seleção com G418 foi estabelecida a linhagem B16mCAR. Esta modificação foi necessária, pois a transdução de células B16F10 com vetores adenovirais do sorotipo 5 é conhecida por ser ineficiente devido à falta do receptor de adenovírus murino CAR (*Coxsackie Adenovirus Receptor*). Esta linhagem, agora pode ser eficientemente transduzidas e por razão de simplicidade será denominada de agora em diante como apenas B16F10 (dados não mostrados). Em seguida a expressão dos transgenes foi confirmada. Células B16F10 foram submetidas ao ensaio de Imunofluorescência para detecção de p19Arf, sendo previamente transduzidas com os vírus AdPGLUC, AdPGp19 ou AdPGIFN β , utilizando como controle negativo o vírus AdPGLUC. Como observado na **Figura 6**, a presença de p19Arf foi detectada no nucléolo, o que indica que está havendo uma expressão confiável do transgene de interesse. A expressão de p19Arf do vetor AdPGFN β IRESp19 também foi confirmada (dados não mostrados).

Figura 6. Ensaio de imunofluorescência para detecção da proteína p19Arf. Células B16F10 foram transduzidas com vetores adenovirais AdPGLUC, AdPGp19 ou AdPGIFN β e 48 horas após a transdução fixadas e coradas.

Para detectar a presença de IFN β , o meio de cultura da B16F10 foi coletado em 48, 72 e 96 horas após a transdução com AdPGIFN β IRESp19 submetido a análise por ELISA (**Figura 7**). Dessa forma, confirmou-se uma expressão de IFN β do vetor AdPGIFN β IRESp19. A expressão de IFN β do vetor AdPGIFN β também foi confirmada em outro experimento (dados não mostrados).

Figura 7. Elisa para detecção de IFNβ. As células B16F10 foram transduzidas com os vetores AdPGIFNβIRESp19 e AdPGLUC e 48, 72 e 96 horas depois o sobrenadante foi coletado para o ensaio de ELISA.

2. Desenvolvimento do modelo de vacinação profilática para melanoma murino

2.A. Primeira estratégia: associação do vetor adenoviral AdPGIFNβIRESp19 e radiação gama

A primeira estratégia para investigar a resposta imunológica induzida pela combinação p19Arf e IFNβ visou associar os efeitos desta combinação com a radiação gama em um protocolo de vacinação profilática para melanoma murino. Neste protocolo a própria célula B16F10 tratada pela combinação é o agente vacinal, responsável por imunizar camundongos imunocompetentes contra um posterior desafio (células B16F10 *naïve*). Para isso, essas células foram transduzidas *ex vivo* com vetor adenoviral bicistrônico AdPGIFNβIRESp19 e após 24 horas tratadas com radiação gama e injetadas (sc) de camundongos C57Bl6. 7 dias após, estes animais foram desafiados no flanco contralateral da vacina com células B16F10 *naïve* e acompanhados quanto ao desenvolvimento tumoral no sítio do desafio. Deste modo, caso o tratamento combinado de p19Arf com IFNβ fosse capaz de ativar uma putativa resposta imune antitumoral, o tumor do desafio teria seu desenvolvimento afetado por essa resposta.

Planejou-se com a radiação: (1) diminuir a viabilidade das células de melanoma para atenuar sua capacidade de gerar tumores e (2) elevar os níveis de expressão do vetor adenoviral AdPGIFNβIRESp19. Este vetor possui em sua região promotora o elemento PG, responsivo à proteína supressora de tumor p53. Tanto a

aplicação da radiação gama para diminuir a viabilidade celular quanto sua capacidade de aumentar os níveis proteicos da p53 está bem estabelecida na literatura (65).

Neste contexto, primeiramente avaliou-se os efeitos da radiação gama sobre as células B16F10. Estas células foram irradiadas com 50 Gy (dose mínima emitida pelo aparelho) ou 100 Gy e 24, 48 e 72 horas após coletadas para análise de viabilidade e ciclo celular por citometria de fluxo (**Figura 8**).

Figura 8. Efeitos da radiação gama sobre a viabilidade e ciclo celular. (A) Viabilidade celular. A célula B16F10 foi irradiada com radiação Gama (50 Gy ou 100 Gy) e após 24, 48 e 72 horas foram coletadas para análise de ciclo celular com PI por citometria de fluxo. Gráfico mostrando o perfil de ciclo celular após a radiação. **(B)** Ciclo celular. **(C)** Histograma demonstrando a parada do ciclo celular em G2 pela sobreposição do ciclo celular antes (roxo) e após (verde) a radiação Gama. **(D)** Histograma confirmando pela coloração com DiIC₁₈ a parada da divisão celular após a radiação gama. Em roxo, a fluorescência emitida no momento zero, antes da radiação, e em verde fluorescência emitida pela célula irradiada com a mesma intensidade da célula no momento zero. Já em rosa a fluorescência emitida pela célula não irradiada decaiu, devido a divisões celulares.

Conforme observado na **Figura 8 A**, a radiação gama diminuiu o número de células viáveis (então com potencial para formar tumor *in vivo*) de uma maneira progressiva ao longo do tempo, com 62% de morte após 72 horas com 50 Gy e 42,5% após 48 horas com 100 Gy. Pelas **Figuras 8 B e C** constatou-se que a radiação gama provocou alterações profundas no ciclo celular tanto na dose baixa quanto alta, induzindo uma parada no ciclo celular em mais de 43% das

células. Esta parada também foi confirmada na **Figura 8 D** pela coloração com o marcador lipofílico de membrana celular DILC₁₈, onde a manutenção da intensidade da fluorescência indica que não ocorreu divisão celular.

O próximo experimento avaliou se a radiação gama é capaz de aumentar a capacidade transcricional da p53 endógena. Para isto, células B16F10 foram transduzidas por vetores retrovirais para expressar o gene repórter eGFP de maneira constitutiva (utilizando o vetor pCLeGFP onde expressão de eGFP é controlada pelo promotor viral constitutivo) ou de maneira p53-dependente (utilizando o vetor pCLPG- Δ U3eGFP, ou simplesmente Δ -eGFP, que possui o promotor PG, responsivo à p53). Essas células, B16pCLeGFP e B16 Δ -eGFP, foram então irradiadas com as mesmas doses do experimento anterior e a intensidade da fluorescência emitida pela proteína eGFP analisada por citometria de fluxo.

Figura 9. Estimulação do promotor PG em resposta à radiação Gama. As células B16pCLeGFP e B16 Δ -eGFP foram irradiadas com radiação Gama (50 Gy ou 100 Gy) e coletadas 48 horas após para análise da expressão relativa de eGFP por citometria de fluxo.

Os resultados na **Figura 9** mostram que irradiação aumentou a intensidade do eGFP na células B16 Δ -eGFP nas duas doses aplicadas, sendo o maior aumento de 29 para 173 com a dose de 100 . A expressão do promotor contido no vetor pCL também foi elevada. Em outro experimento, essas mesmas células foram tratadas com radiação UVC ou UVB e o aumento da expressão do vetor pCL não ocorreu, somente com o promotor PG (dados não mostrados). Destaca-se então, que a radiação gama foi capaz de diminuir progressivamente o número de células viáveis, induzir parada em G2 no ciclo celular e, possivelmente, estimular a atividade da p53.

Em seguida, foi avaliado in vivo se células B16F10 transduzidas pelo vetor adenoviral AdPGIFN β IRESp19 e tratadas com a radiação gama poderiam gerar tumores em camundongos. Na **Tabela 5** abaixo estão descritos os grupos desse

experimento, sendo utilizado para o grupo II o seguinte protocolo: no primeiro dia, células B16F10 foram transduzidas com o vetor AdPGIFN β IRESp19 (MOI 300) e após 24 horas irradiadas com 50 Gy, retornando para cultura celular por mais 24 horas. No terceiro dia, 48 horas após a transdução, 5×10^5 células foram injetadas (sc) no flanco esquerdo do camundongo C57Bl/6. Passados sete dias, esses animais foram desafiados (sc) com 5×10^5 células B16F10 *naïve* no flanco direito. Foi então observado o aparecimento de tumor nos sítios da vacina do desafio.

Tabela 5. Descrição dos grupos no experimento de associação do vetor adenoviral AdPGIFN β IRESp19 e radiação gama.

Grupo	Radiação Gama (50 Gy)	Vetor AdPGIFN β IRESp19 (MOI 300)	Nº de Camundongos C57Bl/6
I	+	-	3
II	+	+	3
III	-	+	3
IV	-	-	2
V	PBS	PBS	3

+ confirmação do tratamento (radiação ou transdução), – ausência do tratamento (radiação ou transdução) e PBS camundongos foram injetados apenas com a solução PBS.

Tabela 6. Resultado do primeiro protocolo de vacinação 17 dias após o desafio.

Grupo	Animal	Presença de Tumor	
		Sítio da Vacina	Sítio do Desafio
I Radiação	1	+	-
	2	+	-
	3	+	-
II Radiação e IFN β IRESp19	1	+	-
	2	+	-
	3	+	+
III IFN β IRESp19	1	+	-
	2	+	-
	3	-	-
IV B16F10	1	+	-
	2	+	-
V Mock (PBS)	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+

+ presença de tumor; – ausência de tumor.

De acordo com este experimento piloto, descrito na **Tabela 6**, observa-se que

a radiação gama em uma dose não letal não inibiu o desenvolvimento de tumor e que o tratamento combinado do vetor AdPGIFN β IRESp19 com a radiação também não impediu o crescimento de tumores, pois todos os animais do grupo I e II desenvolveram. Entretanto, 10 dias após a vacina, 5 dos 6 animais que tinham recebido célula apenas com vírus estavam sem tumor e 17 dias após a vacina, o animal 3 do grupo III ainda não tinha desenvolvido tumor, que só apareceu 19 dias após (dez dias a mais do que o grupo I e IV).

2.B. Segunda estratégia: vacinação profilática com células transduzidas pelo vetor AdPGIFN β IRESp19

Pelo experimento anterior a utilização do vírus se mostrou interessante em retardar a formação de tumor no sítio da vacina e por isso o objetivo da segunda estratégia de vacinação foi otimizar a morte celular induzida pela combinação p19Arf e IFN β . Assim, o MOI de 3.500 do vetor AdPGIFN β IRESp19 foi determinado pela análise do ciclo celular e pela dupla marcação de Annexina e PI (**Figura 10**). O MOI foi padronizado para matar as células somente com vetor bicistrônico, sem que o vetor controle (AdPGLUC) causasse morte com a mesma quantidade de vírus.

A análise do histograma de ciclo celular (**Figura 10 A e B**), mostra que o vetor AdPGIFN β IRESp19 pode induzir morte celular. Pela análise do ensaio de annexina (**Figuras 10 C e D**) foi observado que a maioria das células (47%) são positivas para o marcador de apoptose, annexina, e que apenas 10% das células são positivas para Annexina e PI Neste experimento, o MOI aplicado (3500) pode ser considerado alto e por isso vários experimentos foram feitos para revelar o motivo do efeito causado pelo uso de elevadas quantidades de vírus, por exemplo a cinética da expressão desse vírus, mas uma resposta clara não foi obtida (dados não mostrados).

Figura 10. Indução de morte celular pela combinação IFNβ e p19Arf. Células B16F10 foram transduzidas com os vírus AdPGIFNβIRESp19 e AdPGLUC e coletadas para citometria de fluxo de ciclo celular com coloração de PI e para dupla marcação com Annexina/PI. **(A)** Análise de ciclo celular 48, 72 e 96 horas após a transdução. Gráfico mostrando a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. **(B)** Exemplo de perfil de ciclo celular observado no citômetro. **(C)** Análise da dupla marcação com Annexina V e PI, 72 horas após a transdução. **(D)** Representação do perfil de marcação observado no ensaio de Annexina/PI.

No segundo experimento *in vivo*, a irradiação foi retirada e quantidades diferentes de células transduzidas, no mínimo 10⁴ a no máximo a 10⁶ células, foram administradas em uma única dose ou fracionadas em três aplicações consecutivas, uma a cada semana. O número de células do desafio foi reduzido de 5x10⁵ para 10⁵.

Na **Tabela 7** abaixo estão descritos os grupos experimentais, sendo usado para o grupo II o seguinte protocolo: no primeiro dia, as células B16F10 foram transduzidas com o vetor AdPGIFNβIRESp19 (MOI 3500) e mantidas em cultura por 48 horas. Em seguida, enquanto morrendo, 3,3x10⁵ células tratadas foram e

injetadas (sc) no flanco esquerdo de camundongos C57Bl/6. Esta vacinação foi repetida mais duas vezes, a cada 7 dias, e 7 dias após a última vacinação o desafio foi feito no flanco direito (sc) com 10^5 células B16F10 *naïve*. O desenvolvimento tumoral foi observado nos sítios da vacina e do desafio (**Tabela 8**).

Tabela 7. Descrição dos grupos utilizados no segundo experimento de vacinação.

Grupo	Nº de células na Vacina	Nº de Aplicações	Vetor AdPGIFN β IRESp19 (MOI 3500)	Nº de Camundongos
I	10^6	1X	+	4
II	$3,3 \times 10^5$	3X	+	4
III	10^4	1X	+	4
IV	10^4	3X	+	4
V	10^4	1X	-	3
VI	0	3X	-	2

+confirmação da transdução; – ausência da transdução.

Tabela 8. Resultado do segundo protocolo de vacinação 16 dias após o desafio.

Grupo	Animal	Presença de Tumor	
		Sítio da Vacina	Sítio do Desafio
I 10^6 (1X) IFN β IRESp19	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
	4	-	+
II $3,3 \times 10^5$ (3X) IFN β IRESp19	1	-	+
	2	-	+
	3	-	-
	4	-	-
III 10^4 (1X) IFN β IRESp19	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
	4	-	+
IV 10^4 (3X) IFN β IRESp19	1	-	+
	2	-	+
	3	-	-
V 10^4 (1X) B16F10	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
VI PBS Mock	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+

+ presença de tumor e – ausência de tumor.

Através desse experimento preliminar de vacinação observou-se que não foi formado tumor no sítio da vacina em nenhum dos 15 animais injetados com células tratadas apenas o vetor bicistrônico. Também foi indicado que o número de células e de aplicações pode influenciar o resultado, já que a dose fracionada (3X) mostrou-se mais eficiente do que uma única aplicação e os animais do grupo II e IV tiveram melhores resultados com respeito ao retardo do tumor do desafio (**Figura 11**). Sendo observado no grupo II que um animal estava sem o tumor no sítio do desafio 20 dias depois da vacina. As medidas deste experimento foram feitas a partir da fórmula de volume da esfera, pois o tumor foi medido somente em um eixo. Mesmo sendo atípico esse tipo de quantificação, o resultado ainda sugere que a vacina induziu proteção contra o tumor.

Figura 11. Progressão tumoral no sítio do desafio. Células B16F10 foram transduzidas com o vetor AdPGIFNβIRESp19 (MOI 3500) e, enquanto morrendo, $3,3 \times 10^5$ células tratadas foram injetadas (sc) no flanco esquerdo de camundongos C57Bl/6. Esta vacinação foi repetida mais duas vezes, a cada 7 dias, e sete dias após a última vacinação o desafio foi feito no flanco direito (sc) com 10^5 células B16F10 naïve. O resultado apresentado representa a média dos volumes tumorais de cada grupo $\pm$ o desvio padrão.

Para o próximo experimento, o objetivo foi confirmar o resultado descrito acima. Sendo assim, acrescentou-se ao protocolo o grupo controle que foi vacinado com células B16F10 transduzidas com vetor controle AdPGLUC e 48 horas após mortas por 3 ciclos de congela e descongela. Dessa maneira, seriam fornecidos aos animais antígenos tumorais e virais assim como no grupo injetado com as células transduzidas pelo vetor bicistrônico.

Os grupos desse experimento estão descritos na **Tabela 9** e o protocolo de vacinação consistiu em: no primeiro dia, as células B16F10 foram transduzidas *ex vivo* com o vetor AdPGIFN β IRESp19 (MOI 3500) ou AdPGLUC (MOI 3500) e mantidas em cultura por 48 horas. As células transduzidas pelo vetor AdPGLUC lisadas por 3 ciclos de congela e descongela e logo após, os camundongos C57Bl/6 foram vacinados 3 vezes no flanco esquerdo (sc), 1 vez a cada 7 dias, com PBS ou com 5×10^5 células. 7 dias após a última vacina, esses animais foram desafiados com 10^5 células B16F10 *naïve*, implantando estas no flanco direito (sc). O crescimento do tumor nos sítios da vacina e do desafio foi observado e o volume tumoral baseado na fórmula de Steel (**Tabela 10 e Figura 12**).

Tabela 9. Descrição dos grupos utilizados na vacinação profilática com células transduzidas pelo vetor AdPGIFN β IRESp19.

Grupo	Nº de Células da Vacina	Frequência da Vacina	Vetor Adenoviral	Nº de Camundongos
I	5×10^5	3X	AdPGIFN β IRESp19	3
II	5×10^5	3X	AdPGLUC	4
III	-	3X	PBS	3

– grupo não tratado.

Tabela 10. Resultado da vacinação profilática com células transduzidas pelo vetor AdPGIFN β IRESp19.

Grupo	Animal	Presença de Tumor	
		Sítio da Vacina	Sítio do Desafio
I B16F10 <i>Dying</i> IFN β IRESp19	1	+	-
	2	+	+
	3	+	-
II B16F10 <i>Dead</i> AdPGLUC	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
	4	-	+
III Mock	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+

+ presença de tumor; – ausência de tumor.

B

Figura 12. Progressão tumoral diminuída no sítio do desafio após vacinação com células transduzidas pelo vetor AdPGIFN β IRESp19. (A) Representação esquemática das etapas do modelo de vacinação. Células B16F10 foram transduzidas *ex vivo* com o vetor AdPGIFN β IRESp19 ou com o vetor controle AdPGLUC e mantidas em cultura por 48 horas. Em seguida, camundongos C57BL/6 foram vacinados (sc) 3 vezes, uma vez a cada 7 dias, no flanco esquerdo com PBS, com células morrendo (tratadas pela combinação IFN β e p19Arf) ou com células mortas por ciclos de congela e descongela (transduzidas com o vetor controle AdPGLUC). 7 dias após a última vacina o desafio com células B16F10 *naïve* foi feito no flanco direito (sc). **(B)** Progressão tumoral no sítio do desafio. $n=3$ para o grupo Dying B16F10 + IFN β IRESp19, $n=4$ para o grupo B16F10 Dead + AdPGLUC, $n=3$ grupo Mock. O resultado apresentado representa a média dos volumes tumorais de cada grupo $\pm$ o erro padrão médio. [* $p<0,05$, Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni]

Os resultados apresentados na **Tabela 10** e **Figura 12** mostram que os animais desenvolveram tardiamente tumor no sítio na vacina, em média 20 dias após o início do protocolo. No sítio do desafio o grupo vacinado com a célula transduzida pelo vetor bicistrônico apresentou a progressão tumoral diminuída em

relações aos controles. Após 22 dias do desafio o volume tumoral do grupo tratado (533 ± 188 mm³) era significativamente menor ($p < 0,05$) que o do grupo *Dead B16 + LUC* (1611 ± 399 mm³).

2.C. Terceira estratégia: vacinação profilática com células co-transduzidas pelos vetores AdPGp19 e AdPGIFN β .

A partir dos dados apresentados acima, obteve-se evidências de que a combinação p19Arf e IFN β pode induzir uma proteção antitumoral, mas a presença de tumor no sítio da vacina no momento do desafio pode se tornar um fator limitante para o seguimento dos animais ao longo prazo. Assim, com a finalidade de impedir a formação de tumor no sítio da vacina, optou-se por não trabalhar com o vetor bicistrônico AdPGIFN β IRESp19 e empregar a combinação dos vetores monocistrônicos AdPGp19 e AdPGIFN β . Já que uma das possíveis causas para o desenvolvimento desse tumor seria a transdução ineficiente do vetor bicistrônico, uma vez que para matar as células necessita de um MOI elevado de 3500. Além disso, a produção e utilização dos vetores monocistrônicos tem se mostrado mais consistente e eficiente do que a do bicistrônico na rotina do nosso laboratório.

Dessa forma, determinou-se por citometria de fluxo que o MOI de 900 é adequado para matar significativamente as células B16F10 co-transduzidas pelos vetores adenovirais AdPGIFN β e p19Arf (**Figura 13**).

A **B** **C**

Figura 13. Indução de morte celular pela co-transdução dos vetores monocistrônicos AdPGP19 e AdPGIFNβ. (A) Padronização do MOI. para indução de morte celular. Células B16F10 (3×10^5) foram semeadas em placas de 6 cm e co-transduzidas pelos vetores AdPGP19 e ou AdPGIFNβ com diferentes MOI (300, 500, 700, 900 ou 1200) e após 72 horas foram coletas para análise de ciclo celular com marcação de PI por citometria de fluxo. **(B)** Morte celular induzida somente pelo tratamento combinado de p19Arf com IFNβ. Células B16F10 ($1,2 \times 10^6$) foram semeadas em placas de 10 cm e transduzidas (MOI 900) com vetores AdPGLUC, AdPGP19, AdPGIFNβ ou com os dois vetores AdPGP19 e AdPGIFNβ e após 72 horas foram coletas para análise de ciclo celular com marcação de PI por citometria de fluxo. **(C).** Exemplo de perfil de ciclo celular observado no citômetro.

Uma vez padronizada a transdução, surgiram as questões: o tumor no sítio da vacina interfere no desenvolvimento do tumor do desafio? O tratamento com a combinação dos vetores monocistrônicos impede desenvolvimento do tumor no sítio da vacina? Células transduzidas com estes vetores induzem a resposta antitumoral observada anteriormente?

Assim, para o próximo experimento de vacinação foi seguido o protocolo previamente estabelecido, porém usando os vetores monocistrônicos e adicionando o grupo controle, *Live* B16F10. Neste grupo, 5×10^5 células B16F10 viáveis foram

inoculadas no sítio da vacina 1 semana antes do desafio para responder se a presença de tumor no flanco contralateral do desafio influencia de algum modo o crescimento tumoral no sítio do desafio.

Os grupos deste experimento estão descritos na **Tabela 11** e o protocolo seguido foi: no primeiro dia, células B16F10 foram co-transduzidas *ex vivo* com o vetores AdPGIFN β e AdPGp19 (MOI 900) ou com AdPGLUC (MOI 1800) e mantidas em cultura por 48 horas. As células transduzidas pelo vetor AdPGLUC foram lisadas por 3 ciclos de congela e descongela. Em seguida, os camundongos C57Bl/6 foram vacinados no flanco esquerdo (sc) de com PBS, células não tratadas viáveis, células lisadas ou com células morrendo pela co-transdução dos monocitrônicos. 7 dias após a última vacina, esses animais foram desafiados com 10^5 células B16F10 *naïve*, injetadas no flanco direito (sc). O crescimento tumoral nos sítios da vacina e do desafio foi acompanhado (**Figura 14**).

Tabela 11. Descrição do experimento de vacinação com células co-transduzidas pelos vetores AdPGp19 e AdPGIFN β .

Grupo	Nº de Células na Vacina	Nº de Aplicações da Vacina	Vetor	MOI	Nº de Camundongos
I Dying B16F10 IFN β +p19	3×10^5	3X	AdPGIFN β e AdPGp19	900	5
II Dead B16F10+LUC	3×10^5	3X	AdPGLUC	1800	5
III Live B16F10	5×10^5	1X	-	-	3
IV Mock	0	3X	-	-	5

– Grupo não tratado

E

Figura 14. Proteção antitumoral induzida pela vacinação profilática com células co-transduzidas pelos vetores AdPGp19 e AdPGIFN β . (A) Representação esquemática do protocolo de vacinação. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados 3 vezes, 1 vez a cada 7 dias, no flanco esquerdo (sítio da vacina) com PBS, células tratadas pela combinação, células mortas e transduzidas pelo vetor AdPGLUC ou com células viáveis (apenas 1 aplicação). 7 dias depois da última vacinação, o desafio foi feito no flanco direito (sítio do desafio) com células B16F10 *naïve* e o desenvolvimento tumoral acompanhado. (B) Quantificação da produção de IFN β no momento das vacinações. Células B16F10 foram co-transduzidas com os vetores AdPGIFN β e AdPGp19 ou AdPGLUC e após 48 horas o sobrenadante destas células foi coletado para quantificação de IFN β por ELISA. Protocolo repetido durante as três vacinações. (C) Aparecimento tumoral tardio no sítio da vacina. ** $p < 0,001$, *Log Rank Mantel-cox test*, seguido pelo Wilcoxon pós-teste (D) Progressão tumoral reduzida no sítio da vacina. O resultado apresentado representa a média dos volumes tumorais de cada grupo $\pm$ o erro padrão médio. [$*p < 0,05$, Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni]. (E) Progressão tumoral no sítio do desafio. Dying B16F10 p19+IFN β ($n=5$); Dead B16F10+LUC ($n=5$); Mock ($n=5$); Live B16F10 ($n=3$). O resultado apresentado representa a média dos volumes tumorais de cada grupo $\pm$ desvio padrão. [n.s. (não significativo), $*p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni].

Pelo resultado deste experimento observa-se que o desenvolvimento de tumor no sítio da vacina não foi influenciado pela co-transdução com os monocistrônicos AdPGp19 e AdPGIFN β , sendo este visualizado em média 24 dias após a primeira injeção e significativamente ($p < 0,01$) mais tarde que o do grupo *LIVE B16* (**Figura 14 C**). Estes tumores originados de células tratadas pela combinação possuem uma progressão tumoral diferente do que de tumores originados de células não tratadas ($p < 0,05$), já que o tumor do grupo p19+IFN β apresentou um crescimento mais desacelerado em relação ao grupo *LIVE B16F10* (**Figura 14 D**).

Além disso, pode-se sugerir que a presença de tumor no sítio da vacina não interfere no desenvolvimento do tumor do desafio, porque os animais do grupo *Live B16F10*, que foram injetados na vacina com células B16F10 viáveis não tiveram diferença significativa com os grupos *Mock* e *Dead B16 + LUC* (**Figura 14 E**). Dessa maneira, nas condições estudadas, apenas a vacinação com células B16F10 tratadas pela combinação de vetores monocistrônicos reduziu significativamente ($p < 0,01$) o volume tumoral do desafio ($66,5 \pm 115 \text{ mm}^3$) em relação aos controles *DEAD B16 + LUC* ($394 \pm 180 \text{ mm}^3$) (**Figura 14 E**).

2.D. Investigação de possíveis causas para o desenvolvimento de tumor no sítio da vacina.

O objetivo dos próximos experimentos foi investigar possíveis causas para o desenvolvimento de tumor no sítio da vacina, mesmo após a indução de morte celular pelo tratamento combinado de p19Arf com IFN β .

Desta maneira, o primeiro experimento analisou *in vitro* através do ensaio clonogênico a resistência à morte celular da linhagem B16F10 ao tratamento com os vetores AdPGLUC, AdPGp19, AdPGIFN β ou à combinação do vetor AdPGp19 com AdPGIFN β (**Figura 15 A e B**).

O segundo experimento investigou *in vivo* por qual tratamento o desenvolvimento de tumor é mais afetado. Dessa forma, em camundongos C57Bl/6 foram injetadas (sc) 10^5 células B16F10 *naïve* ou células tratadas pelos vetores AdPGLUC, AdPGp19, AdPGIFN β ou pela combinação dos vetores AdPGp19 com AdPGIFN β e estes foram observados por 70 dias quanto a formação de tumor (**Figura 15 D**).

O terceiro experimento avaliou *in vivo* a influência do número de células e de aplicações no desenvolvimento de tumor a partir de células B16F10 tratadas pela combinação p19Arf e IFN β (descrito na **Tabela 12**). Para isso, foram injetadas em camundongos (sc) diferentes quantidades de células (10^4 , 5×10^4 , 10^5 ou 3×10^5) tratadas ou não pelos dois vetores AdPGp19 e AdPGIFN β , em uma única aplicação ou em três aplicações, uma vez a cada sete dias. Posteriormente, esses animais foram acompanhados por 70 dias quanto ao aparecimento de tumor (**Figura 15 E**).

Esperava-se através desses 3 experimentos, observar a influência dos tratamentos na formação de tumores, assim como demonstrar uma relação entre o número células e de aplicações com a incidência de tumores nos animais.

Tabela 12. Descrição dos grupos utilizados na investigação de possíveis causas para o desenvolvimento de tumor no sítio da vacina.

Grupo	Nº de células injetadas por aplicação	Nº de aplicações	Vetor Adenoviral	MOI	Nº de Camundongos
I-A	10^4	1X	-	-	5
I-B	10^4	1X	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	5
II-A	5×10^4	1X	-	-	5
II-B	5×10^4	1X	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	5
III-A	10^5	1X	-	-	5
III-B	10^5	3X	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	5
IV-A	3×10^5	1X	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	5
IV-B	3×10^5	3X	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	5
V	10^5	1X	AdPGLUC	1800	5
VI	10^5	1X	AdPGp19	900	5
VII	10^5	1X	AdPGIFN β	900	5
VIII	10^5	1X	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	5

– ausência da transdução.

A

B

C

D

E1

E2

E3

Figura 15. Investigação de possíveis causas para o desenvolvimento de tumor no sítio da vacina. (A) O tratamento com p19Arf e com a combinação p19Arf e IFN β diminuem o número de colônias tumorais. Células B16F10 foram transduzidas com os vetores AdPGLUC (MOI 1800), AdPGp19, AdPGIFN β (MOI 900) ou com a combinação AdPGp19 mais AdPGIFN β (MOI 900 para cada vetor) e após 24 horas 500 células foram semeadas em placas de 10cm para formação de colônias tumorais. No 10º dia em cultura, as colônias formadas foram fixadas e coradas para contagem. Gráfico mostrando a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. [*p<0,005, One-way Anova, seguido pelo pós-teste de Tukey] **(B)** Placas representativas do ensaio clonogênico. **(C)** Representação esquemática do experimento *in vivo*. **(D)** Somente quando a p19Arf e o IFN β são combinados o desenvolvimento tumoral é abolido. Camundongos C57Bl/6 foram injetados (sc) no flanco esquerdo com 10⁵ células B16F10 tratadas ou não com luciferase, P19Arf, IFN β ou com a combinação p19 e IFN β e mantidos por 70 dias para observação do aparecimento de tumores. **(E)** O número de células e de aplicações influencia o aparecimento de tumor. Camundongos C57Bl/6 foram injetados (sc) no flanco esquerdo 1 vez (1X) ou 3 vezes (3X) com diferentes quantidades de células B16F10 (10⁴, 5x10⁴, 10⁵ ou 3x10⁵) tratadas com a combinação p19Arf e IFN β ou não. O desenvolvimento tumoral nestes animais foi acompanhado por 70 dias. n=5 para todos os grupos. [n.s (não significativo), **p<0,01, ***p<0,001, Log Rank Mantel-cox test, seguido pelo Wilcoxon pós-teste].

Através do ensaio clonogênico (**Figura 15 A e B**) constatou-se que tanto o tratamento com p19Arf quanto com a combinação p19Arf e IFN β diminuem drasticamente o número de colônias tumorais ($p<0,05$). Já quando as células transduzidas pelos vetores AdPGLUC, AdPGp19, AdPGIFN β ou pela combinação AdPGp19Arf e AdPGIFN β foram inoculadas em camundongos imunocompetentes somente com a combinação não houve desenvolvimento do tumor ($p<0,001$). Os animais que receberam células tratadas apenas com IFN β permaneceram por mais tempo livres de tumor do que os que foram injetados com células tratadas só pela p19Arf (**Figura 15 D**). A utilização de células B16F10 *naïve* gera tumor em todas as condições testadas, mesmo quando são aplicadas apenas 10^4 células. O aumento do número dessas células acelera o aparecimento dos tumores, já que partindo de 10^4 células 50% dos animais desenvolvem tumor 28 dias após a injeção, com 5×10^4 em 15 dias e com 10^5 células depois de 8 dias (**Figura 15 E**).

Também foi observado que o desenvolvimento de tumor é influenciado pelo número de aplicações, já que células tratadas pela combinação p19Arf e IFN β tendem a não gerar tumores quando aplicadas em uma única dose, mesmo variando a quantidade injetada. Porém quando uma mesma quantidade de células foi fracionada em três aplicações, o desenvolvimento de tumor foi observado ($p<0,01$). Esse desenvolvimento também pode ser intensificado pelo número de células, pois quando são administradas 3×10^5 células em três doses, 50% dos animais desenvolvem tumor com 20 dias, 15 dias antes do que o grupo que recebeu 10^5 células 3 vezes (**Figura 15 E**).

2.E. Investigação da duração da proteção antitumoral conferida pela vacinação.

No experimento a seguir investigou-se a duração da proteção antitumoral conferida pela vacinação e sua relação com a quantidade células usada na imunização. Para isso foram usados os mesmo camundongos livres de tumor da **Figura 15**, que foram injetados 1 vez com diferentes quantidades (5×10^4 , 10^5 , 3×10^5) de células B16F10 tratadas pela combinação p19Arf e IFN β . Foi aplicada então, no flanco esquerdo (sc) 1 dose de *boost* de 5×10^4 células B16F10 tratadas pela mesma combinação e três dias após estes animais foram desafiados com 10^5 células B16F10 *naïve* no flanco direito (sc). No grupo controle foram injetadas 3 vezes, 7 dias antes do desafio, células transduzidas com o vetor AdPGLUC e mortas por

ciclos de congela. O crescimento tumoral no sítio do desafio foi observado. Os grupos deste experimento estão descritos na **Tabela 13** abaixo, assim como o resultado na **Figura 16**.

Tabela 13. Descrição dos grupos do experimento de investigação da duração da proteção antitumoral conferida pela vacinação e sua relação com a quantidade de células usada na imunização.

Grupo	Nº de células injetadas	Nº de aplicações	Vetor Adenoviral	MOI	Nº de Camundongos
I	5×10^4	1X	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	5
II	10^5	1X	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	5
III	3×10^5	1X	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	4
IV	3×10^5	3X	AdPGLUC	1800	4

Figura 16. A vacinação com células tratadas pela combinação p19Arf e IFN β mantém a proteção antitumoral mesmo 70 dias após a vacinação. Camundongos C57Bl/6 foram vacinados no flanco esquerdo com diferentes quantidades (5×10^4 , 10^5 , 3×10^5) de células B16F10 morrendo e tratadas pela combinação p19Arf e IFN β ou com células mortas e transduzidas pelo AdPGLUC. Após 70 dias dessa vacinação, foi aplicada no flanco esquerdo (s.c) uma dose de *boost* com 5×10^4 células B16F10 morrendo e tratadas pela combinação p19Arf e IFN β e três dias depois estes animais foram desafiados no flanco direito (s.c) com 10^5 células B16F10 *naïve*. O crescimento tumoral foi então observado. n= 5 para os grupos DYING B16F10 p19+IFN β 5×10^4 e 3×10^5 . n= 4 para os grupos DYING B16F10 p19+IFN β 10^5 e DEAD B16F10 + LUC. O resultado apresentado é a média dos volumes tumorais de cada grupo $\pm$ o desvio padrão. [n.s (não significativo), ***p<0,001, Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni]

Na **Figura 16**, observa-se que o protocolo de vacinação mantém a proteção antitumoral mesmo após 73 dias da vacinação. Já que no sítio do desafio a redução do volume e da progressão tumoral foram semelhantes aos experimentos das **Figuras 12 e 14** em que o desafio foi feito 7 dias após a vacinação. Os

camundongos que receberam o *boost* com 5×10^4 células e a vacina com 5×10^4 células falharam em responder ao desafio. A ausência desta resposta também ocorreu no grupo vacinado com apenas 10^4 células (dados não mostrados), sendo, esta resposta só observada com 10^5 e 3×10^5 células.

2.F. Investigação do papel da p19Arf e do IFN β na resposta ao desafio tumoral

O objetivo do próximo experimento foi averiguar se a redução da progressão tumoral induzida após a vacinação com células tratadas pela combinação é mais dependente da p19Arf ou do IFN β . Dessa forma, camundongos foram vacinados com células tratadas só com p19Arf ou IFN β e o resultado do desafio tumoral nesses animais comparado com o grupo que recebeu células tratadas pela combinação.

Neste experimento, a etapa de vacinação visou imunizar e retardar a formação de tumores no sítio da vacina através da redução do número de células e aplicações da vacina. Sendo assim, as células foram aplicadas em 2 doses: a primeira denominada “*prime*” com apenas 10^5 células e sete dias depois, a segunda, denominada “vacina” com 3×10^5 células. Ademais, o benefício deste protocolo na sobrevivência desses animais também foi acompanhado. Para esta análise de sobrevivência a área total afetada pelos tumores foi utilizada (soma dos volumes dos tumores da vacina e do desafio) e quando a soma era maior que 2000 mm^3 os camundongos eram sacrificados.

Para o grupo controle, 4×10^5 células tumorais transduzidas com o vetor adenoviral (AdPGLUC) foram aplicadas no sítio da vacina 7 dias antes do desafio para formação de tumor. A presença desse tumor no flanco oposto ao do desafio poderia indicar a interferência deste na resposta contra o desafio. A descrição dos grupos utilizados neste experimento se encontra na **Tabela 14** e a resposta na **Figura 17**.

Tabela 14. Descrição dos grupos usados na investigação do papel da p19Arf e do IFN β na resposta ao desafio tumoral.

Grupo	N° de células injetadas no <i>Prime</i>	N° de células injetas na Vacina	Vetor Adenoviral	MOI	N° de Camundongos
I B16 + IFN β	10^5	3×10^5	AdPGIFN β	900	5
II B16 + p19Arf	10^5	3×10^5	AdPGp19	900	7
III B16 + p19+IFN β	10^5	3×10^5	AdPGp19 e AdPGIFN β	900	6
IV B16 + LUC	0	4×10^5	AdPGLUC	1800	4
V Mock	0	-	-	-	4

- grupo não tratado.

A

B

C

D

Figura 17. Proteção antitumoral induzida pela vacinação com células tratadas só por IFN β ou pela combinação p19Arf e IFN β . (A) Representação esquemática do protocolo de vacinação. Células B16F10 foram transduzidas *ex vivo* com os vetores AdPGLUC (MOI 1800), AdPGp19, AdPGIFN β (MOI 900) ou com a combinação AdPGp19 e AdPGIFN β (MOI 900 para cada vetor) e mantidas em cultura por 48 horas. Em seguida, camundongos C57BL/6 foram vacinados com essas células conforme representado. 7 dias após a vacina, o desafio com células B16F10 *naïve* foi feito no flanco direito (sc). (B) Desenvolvimento de tumor no sítio da vacina. [*** $p < 0,001$, *Log Rank Mantel-cox test*, seguido pelo Wilcoxon pós-teste]. (C) Progressão tumoral no sítio do desafio. O resultado apresentado representa a média dos volumes tumorais de cada grupo $\pm$ desvio padrão. [* $p < 0,05$, *** $p < 0,05$. *Two-way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni]. (D) Curva de sobrevida após vacinação. Os camundongos foram sacrificados quando a soma dos volumes tumorais do sítio da vacina e do desafio era igual ou maior que 2000 mm³ ou quando aparentavam estar moribundos. [*** $p < 0,001$, *Log Rank Mantel-cox test*, seguido pelo Wilcoxon pós-teste]. $n=5$ para os grupos B16 + p19, $n=4$ para os grupos Mock e B16 + LUC, $n=7$ grupo B16 + IFN β e $n=6$ no grupo B16 + p19+IFN β .

A partir da **Figura 17 B** observa-se que no sítio da vacina os tumores do grupo p19+IFN β apareceram mais tardiamente e em uma menor porcentagem do que nos outros grupos ($p < 0,001$). Conforme indicado pelo grupo B16+LUC a presença de tumor no sítio da vacina não afeta a progressão tumoral no sítio do desafio (**Figura 17 C**). Neste sítio do desafio a progressão tumoral também não foi alterada nos animais vacinados com células tratadas somente com p19Arf. Mas já nos grupos vacinados com as células tratadas só por IFN β ou pela combinação a progressão tumoral foi reduzida ($p < 0,01$), não havendo diferença significativa entre estes dois grupos (**Figura 17 C**). Porém ao analisar o benefício do protocolo de vacinação na sobrevida, somente o tratamento com a combinação aumentou a sobrevida dos camundongos vacinados ($p < 0,05$) (**Figura 17 E**).

3. Investigação de mecanismos celulares e moleculares induzidos pela combinação p19arf e IFN β

3.A. Investigação de componentes chaves da via Arf/Mdm2/p53 por RT-qPCR

A função mais bem definida de Arf é suprimir a proliferação celular aberrante pela ativação do fator de transcrição p53 (43). A p53 por sua vez induz a expressão de genes ligados ao controle do ciclo celular tais como o p21^{WAF1}, genes pró-apoptóticos como o Bax e Puma; e genes ligados à sua própria regulação como Mdm2 (66). A p53 também pode também inibir a transcrição de genes que bloqueiam apoptose, como Bcl-2 (67). Além da p19Arf, já foi mostrado que o IFN β também pode aumentar a expressão da p53 (68). Dessa forma, o nível de expressão de componentes chaves da via Arf/Mdm2/p53 foram analisados por RT-qPCR para investigar se a p53 está transcricionalmente ativa. Células foram coletadas 48 horas após a transdução e o RNA total isolado e processado para análise (**Figura 18**).

Figura 18. Ativação de genes alvos de p53 na presença de p19Arf. Células foram transduzidas pelos vetores AdPGLUC (MOI 1200), AdPGp19, AdPGIFNβ ou pela combinação AdPGp19 e AdPGIFNβ (MOI 600) e incubadas por 48 horas antes da purificação do RNA total e processamento para RT-qPCR. O gene de referência foi a β-actina, porém resultados semelhantes também foram observados usando os genes 28S ou GAPDH. O método de análise foi 2-ΔΔCt e a os dados estão apresentados como *fold change* (log₂) comparados com células não transduzidas. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. *p<0,05, One-way Anova seguido do *Tukey's Multi comparisont* pós-teste.

Os genes alvos de p53, p21Waf1, Mdm2 e PUMA estavam significativamente mais expressos (p<0,05), mesmo a Bcl-2 não estando alterada. O transcrito da

p19Arf foi super expresso nas células tratadas pelo vetor AdPGp19, porém os níveis de expressão da p53 não estavam alterados, sugerindo que a reposição de p19Arf ou a presença de IFN-beta não foram capazes de alterar sua expressão. A presença de IFN-beta não alterou nenhum dos genes estudados, assim como a combinação p19 e IFN β não exerceu efeito sinérgico nos genes. De modo que, o aumento da expressão desses genes alvo de p53 só foi observado após a reposição de Arf.

3.B. Investigação do envolvimento do sistema imune na rejeição de tumores tratados com IFN β ou pela combinação p19Arf e IFN β

Na **Figura 15** foi mostrado que células tratadas com combinação p19Arf e IFN β não formam tumores quando inoculadas em camundongos imunocompetentes e que nos animais que receberam as células tratadas com apenas IFN β os tumores apareceram mais tardiamente e em menor número do que receberam as células tratadas só com Arf ou LUC. Dessa maneira, como o IFN β pode mediar efeitos antitumorais por mecanismos independentes do sistema imune, como modulação da angiogênese tumoral, morte celular ou redução da proliferação celular, não está claro se esses tumores não se desenvolveram por ações do IFN β no sistema imunológico. Então para averiguar o envolvimento do sistema imune na rejeição desses tumores, foi realizado um protocolo de imunossupressão antes, durante e depois a inoculação das células. Assim, o sistema imune teria seus mecanismos antitumorais atenuados pela imunossupressão, permitindo que as células inoculadas desenvolvessem tumores.

Camundongos C57Bl/6 imunocompetentes foram injetados no flanco direito (sc) com dexametasona (3 ou 10mg/kg/dia) ou PBS por 19 dias totais, sendo as 2 últimas aplicações feitas com intervalo de 2 dias. Após 8 dias de tratamento, foram inoculadas no flanco esquerdo (sc) células transduzidas com os vetores AdPGLUC, AdPGIFN β ou com a combinação do AdPGp19 e AdPGIFN β . A imunossupressão continuou por mais 8 dias e os camundongos foram acompanhados para o desenvolvimento de tumores, sendo que no décimo segundo dia foi colhido sangue periférico dos grupos LUC, LUC+3DEX e LUC+10DEX para realização do leucograma diferencial.

A **B** **C** **D**

Figura 19. Imunossupressão revela influência do sistema imunológico na formação de tumores a partir de células tratadas com IFN β ou com a combinação p19Arf e IFN β . (A) Representação esquemática do protocolo de imunossupressão. Camundongos C57Bl/6 imunocompetentes foram injetados no flanco direito (sc) dexametasona (3 ou 10mg/kg/dia) por 19 dias contínuos, sendo as 2 últimas aplicações feitas com intervalo de 2 dias.. Após 8 dias de tratamento, foram inoculadas no flanco esquerdo (sc) 10^5 células B16F10 transduzidas com os vetores AdPGLUC (MOI 1800), AdPGIFN β (MOI 900) ou com a combinação do AdPGp19 e AdPGIFN β (MOI 900 para cada vetor). A imunossupressão continuou por mais 8 dias e os camundongos foram acompanhados para quanto ao desenvolvimento de tumores, sendo que no 7º dia foi colhido sangue periférico dos grupos LUC, LUC+3DEX e LUC+10DEX para realização do leucograma. (B) Contagem de células brancas no sangue periférico. n=5 para todos os grupos. [*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 One-way Anova seguido do Tukey's Multi comparisont pós-teste.] (C) Leucograma diferencial. n=5 para todos os grupos. [**p<0,01, ***p<0,001 One-way Anova seguido do Tukey's Multi comparisont pós-teste.] (D) O desenvolvimento de tumores é acentuado em camundongos imunossuprimidos. n=5 para todos os grupos exceto para o grupo IFN β +3DEX (n=4). [*p<0,05, Log Rank Mantel-cox test, seguido pelo Wilcoxon pós-teste].

O protocolo de imunossupressão utilizando a dexametasona reduziu significativamente ($p<0,001$) a porcentagem de linfócitos 59,4 (Mock) para 43,8 (3DEX) ou 38,8% (10DEX) a índices abaixo do valor de referência (aproximadamente 60%), caracterizando um quadro de linfopenia. Os eosinófilos também tiveram uma redução de 2% (Mock) para 0% (3DEX) ou 0,4% (10DEX) abaixo do valor de referência (aproximadamente 2%). As populações de monócitos e basófilos não sofreram alterações com o tratamento. Porém, os neutrófilos aumentaram ($p<0,001$) em ambas as dosagens de 36,8% (Mock) para 54,8% (3DEX) e 59,4% (10DEX), crescendo também as subpopulações de neutrófilos bastonetes ($p<0,001$) e segmentados ($p<0,01$) (**Figura 19 C**). Na contagem total, a imunossupressão elevou progressivamente o número total de leucócitos de $6,1 \times 10^3$ células/mm³ (Mock) para 9×10^3 (3DEX) e 11×10^3 (10DEX) (**Figura 19 B**).

O desenvolvimento tumoral também foi alterado pela imunossupressão, porém esse efeito só foi observado nos camundongos em que foram injetadas

células tratadas com IFN β ou com a combinação p19Arf e IFN β . Pois, nos animais que foram inoculadas células transduzidas pelo vetor controle não foi observada diferença no número de camundongos livres de tumor entre os que eram imunocompetentes ou imunossuprimidos, apresentando tumores em mais de 70% desses animais 12 dias após a injeção das células (**Figura 19 D**). Nos outros dois grupos, a dose de 10mg/kg/dia de dexametasona diminuiu a porcentagem de animais livres de tumor, desenvolvendo tumores em todos os animais do grupo IFN β ($p=0,1$) e em 40% do grupo da combinação ($p=0,07$). Os grupos p19+IFN β imunocompetentes e imunossuprimidos (3mg/kg/dia) apresentaram significativamente mais animais livres de tumor do que todos os grupos IFN β , imunocompetentes ou não ($p<0,05$). De modo que, mesmo sendo imunossuprimidos com a dose de 10mg/kg/dia os animais da combinação tiveram menos tumores do que o grupo IFN β imunocompetentes e os imunossuprimidos com 3 ou 10mg/kg/dia de dexametasona ($p<0,05$) (**Figura 19 D**).

3.C. Investigação do envolvimento dos linfócitos T *Helper* e T citotóxico

Em seguida, foi investigado o envolvimento dos linfócitos T *Helper* (CD3 $^+$ e CD4 $^+$) e T citotóxico (CD3 $^+$ e CD8 $^+$) na fase efetora da resposta imune. Para isso, a depleção desses linfócitos foi feita logo após a vacinação e antes do desafio, injetando (ip) anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8 para inibir a ação dessas células na progressão tumoral do desafio. O primeiro passo para a realização deste experimento foi produzir em camundongos *Nudes* os anticorpos controle do isotipo (IgG1), anti-CD4 e anti-CD8, através da injeção (ip) dos hibridomas UF5H2 (ligante do CEA, antígeno tumoral humano), GK 1.5 (anti-CD4) e 53.6-7 (anti-CD8). Após isso, o líquido ascítico formado nesses camundongos foi coletado e o plasma, contendo os anticorpos, foi aliquotado e armazenado. Padronizou-se o protocolo de depleção e confirmar a depleção específica dos linfócitos T alvos. Para isso, plasma produzido em camundongos *Nudes* foi injetado em camundongos C57BL/6 imunocompetentes em 3 doses (de 50, 100 ou 200 μ L) 1 vez a cada 2 dias, após a última injeção o baço e os linfonodos inguinais foram coletados para confirmar por citometria de fluxo a ausência das células alvo nestes órgãos (**Figura 20**).

A

B

Figura 20. Padronização da depleção dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. O plasma produzido em camundongos *Nudes* foi injetado em camundongos C57BL/6 imunocompetentes em 3 doses (de 50, 100 ou 200 µL) 1 vez a cada 2 dias e após dois dias o baço (A) e o Linfonodo inguinal (B) foram coletados para análise da presença dos linfócitos T *Helper* (CD3⁺ e CD4⁺) e T citotóxico (CD3⁺ e CD8⁺) por citometria de fluxo. n=2 em todos os experimentos. GK 1.5 hibridoma produtor do anticorpo anti-CD4 e 53.6-7 do anti-CD8. *Pool* refere-se ao homogeneizado dos linfonodos de dois animais.

A partir da **Figura 20** observa-se que os anticorpos produzidos e o protocolo estabelecido são capazes de eliminar sistemicamente os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, já que mais de 98% dessas células foram depletadas tanto no linfonodo inguinal quanto no baço.

O papel dessas populações de linfócitos também será estudado pela quantificação da presença dessas células nos tumores do desafio. Para isso, os camundongos serão vacinados e desafiados seguindo o protocolo previamente estabelecido. O tumor formado no sítio do desafio será extraído e os linfócitos infiltrantes T *Helper* e T citotóxicos quantificados por meio de citometria de fluxo. O protocolo necessário para fazer esta análise foi padronizado e o resultado se encontra na **Figura 21**.

Figura 21. Padronização da análise dos linfócitos infiltrantes no tumor do desafio. Camundongos C57BL/6 foram vacinados no flanco esquerdo com PBS (Mock) ou com células B16F10 tratadas com a combinação P19Arf e IFN β e após duas vacinações foram desafiados com células B16F10 *naïve* no flanco direito. Quando o tumor do desafio atingiu 8mm em uma dimensão este foi retirado e dissociado para análise de citometria de fluxo dos linfócitos T *Helper* (CD3⁺ e CD4⁺) e T Citotóxicos (CD3⁺ e CD8⁺) presentes em sua massa. n=1 para todos os grupos.

A partir dos resultados apresentados nas **Figuras 20 e 21** confirma a padronização da depleção dos linfócitos T e da análise dos linfócitos infiltrantes do tumor. Estes experimentos serão realizados em breve para investigar os mecanismos celulares responsáveis pela resposta imune induzida pela combinação p19Arf e IFN β .

DISCUSSÃO

O desenvolvimento e aprimoramento de vetores virais é um dos objetivos centrais do Laboratório de Vetores Virais. Neste sentido, vetores adenovirais contendo a segunda geração do denominado promotor PG, responsivo à p53, foram empregados neste trabalho. Na primeira geração, descrita em 2004, o elemento PG foi usado para modificar o promotor LTR (*Long Terminal Repeat*) do vetor retroviral pCL, criando o vetor pCLPG que atinge um nível de expressão sete vezes maior do que o obtido com o vetor parental pCL (61). Também foi observado que quando a p53 é codificada pelo próprio vetor pCLPG, o efeito de inibição da proliferação de células tumorais é superior ao efeito visto com o vetor parental (60-62).

Para a segunda geração desses vetores reponsivos à p53, foram empregados em vetores adenovirais, pois estes oferecem altos títulos, são eficientes na transferência gênica *in situ* e como o seu material genético não se integra ao genoma da célula alvo, sua expressão é transiente. Estas características são particularmente interessantes para a terapia gênica do câncer. Dessa maneira, foi criado o promotor quimérico chamado de PGTx β , que é uma fusão do elemento PG responsivo à p53 (57), com o promotor mínimo de adenovírus E1B e o intron *rabbit β -globin* (70). Este promotor foi inserido em um vetor adenoviral do sorotipo 5 usado para dirigir a expressão do gene repórter luciferase, resultando em altos níveis de expressão especificamente controlados por p53 (62).

Recentemente, a terceira geração destes vetores foi desenvolvida inserindo esse promotor quimérico PGTx β em vetores virais recombinantes derivados de vírus adenoassociado (71). Ensaios *in vitro* mostraram que na presença de p53 a expressão do vetor aumenta mais que mil vezes e também poderia ser usado como um biosensor da atividade p53 em diferentes condições como de estresse biomecânico e hipóxia. *In vivo*, essa função vigilante da atividade p53 também foi observada após a injeção do quimioterápico doxorrubicina em camundongos portadores de tumores B16F10 transduzidos com o vetor adenoassociado codificador para luciferase. A paritr destes trabalhos, é possível afirmar que os vírus portadores do elemento PG além de serem dirigidos por p53, possuem um nível de expressão superior aos vírus parentais, maior efeito funcional no caso do vetor

pCLPGp53 e possibilitam o monitoramento da atividade transcricional da proteína p53.

Outro objetivo do nosso laboratório é a utilização desses vetores para o estudo e tratamento do câncer. Com essa finalidade, em um trabalho recente do nosso grupo os genes da p19Arf e do IFN β foram inseridos sob o controle do promotor quimérico PG em vetores adenovirais do sorotipo 5, criando os vetores AdPGp19 e AdPGIFN β , respectivamente. *In vitro*, a transferência de apenas um desses genes no melanoma murino B16mCAR (modificado para expressar o receptor murino do adenovírus) resultou em aumento moderado de células sub-G0, mas quando esses eram transferidos juntos um aumento massivo de células sub-G0 foi observado. Ademais, o mecanismo de morte consistente com apoptose foi revelado pela marcação positiva de Annexina V e a clivagem da caspase 3. Os tumores B16mCAR foram formados e tratados em um modelo de terapia gênica *in situ*, tendo sua progressão tumoral significativamente reduzida tanto pela transdução com apenas IFN β ou com a combinação p19+IFN β . Entretanto, a marcação positiva para morte *in situ* (ensaio Tunnel) e o aumento da sobrevida só foram observados no grupo tratado com a combinação (63).

Em resumo, os dados acumulados até o momento apontam um processo de morte consistente com apoptose. Mas como o mecanismo de morte ativado pela combinação dos genes ainda não foi investigado, é possível hipotetizar o envolvimento de três componentes neste processo: a p53, a p19Arf e o IFN β .

A apoptose pode ser desencadeada em resposta a uma variedade de sinais, os quais podem ativar a via extrínseca e ou a via de morte intrínseca. A p53 pode agir em vários níveis dessas vias através da indução de múltiplos genes pró-apoptóticos, assim como por meio de mecanismos independentes de transcrição (72). De uma maneira clássica, na via intrínseca, a p53 induz a expressão de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como Bax e Bak, e de outros genes ativadores como Puma e Noxa. Além disso, a p53 inibe a transcrição de genes anti-apoptóticos da família Bcl-2 como Bcl-2 e Bcl-x, que protegem a mitocôndria para impedir a consequente liberação do citocromo c e ativação das caspases efetoras (73). Na via extrínseca, a p53 pode sensibilizar a célula para a ligação com os ligantes de morte pela expressão dos receptores de morte Fas (CD95) e TRAIL (74). Além disso, em certas condições a p53 pode promover a apoptose sem a ativação

desses genes alvos, ao se ligar diretamente com a mitocôndria, alterar seu potencial transmembranico e iniciar via intrínseca da apoptose (75).

O envolvimento transcricional da p53 mediante o tratamento da combinação foi observado neste trabalho através da expressão de componentes chaves da via Arf/Mdm2/p53 por RT-qPCR (**Figura 18**). Os genes alvos de p53, p21Waf1, Mdm2 e PUMA estavam significativamente mais expressos, mesmo a Bcl-2 e a própria p53 não estando alterados. A reposição de p19Arf ou a presença de IFN-beta não foram capazes de alterar sinergicamente a expressão dos genes estudados, sendo que somente a presença de IFN β também não alterou nenhum desses genes. Assim, pode-se considerar que a reposição de Arf foi a responsável pelo aumento dos genes alvo de p53, indicando a possibilidade que o tratamento com o vetor AdPGp19 induziu a atividade transcricional de p53.

Entretanto, como observado em outro trabalho do nosso grupo (Merkel et al., 2010), a superexpressão de p53 na linhagem B16F10, portadora de p53 selvagem, não é capaz de induzir morte celular, assim como a associação de p53 e IFN β que também não foi capaz de matar essas células. A capacidade de induzir morte pela reposição ou expressão de p53 parece ser ligada com o estado da p53 endógena da célula e ou de componentes chaves da sua via, como Arf. Por exemplo, as linhagens B16F10 e LLC-1 (p53 selvagem) são resistentes ao tratamento com p53 exógenos e sensíveis a reposição de Arf, já as linhagens PC3 e DU145 (p53 nulo e mutado, respectivamente) são sensíveis ao tratamento com p53 exógeno (dados do LVV não mostrados).

O primeiro estudo do nosso grupo que buscou restabelecer a atividade antitumoral de p53 pela reposição de Arf foi realizado em 2010. As linhagens B16F10 e C6 (glioma murino, p53 selvagem) foram transduzidas com o vetor retroviral pCLPGp19 para transferir a Arf ou tratadas com Nutlin-3 (uma molécula capaz de impedir a ligação de p53 com Mdm2). Na B16F10, a ativação funcional da p53 endógena foi particularmente difícil de ser conseguida e ocorreu somente quando a transferência de p19Arf foi combinada com Nutlin-3, resultando no aumento da trans-ativação de p53, alterações profundas no ciclo celular e viabilidade reduzida em cultura. *In vivo*, tumores B16F10 tratados com p19Arf e nutlin-3 se tornaram mais necróticos e com marcação reduzida do marcador de proliferação BrdU. Em comparação, as células C6 foram bastante susceptíveis a

qualquer um dos tratamentos, e ainda tiveram a p53 ativada pela combinação de p19Arf e nutlin-3 (64).

Apesar do tratamento com apenas o vetor AdPGIFN β na célula B16F10 não ter aumentado a expressão de p53, Takaoka e colaboradores em 2003 mostraram que o IFN α/β estimula a transcrição de p53 resultando em um aumento da quantidade de proteína p53 nas células.. Neste estudo foi identificado no promotor do gene de p53, um elemento ISRE, responsivo a ISGF3 envolvido na cascata de sinalização dos IFNs tipo I. Embora os IFNs não sejam responsáveis pela ativação direta dessa proteína (a ativação ocorre através de modificações pós-transducionais) e eles contribuem para aumentar a sensibilização de p53 frente a sinais de estresse celular (68).

Nesse mesmo estudo também foi demonstrado que a morte de células tumorais tratadas com a proteína recombinante IFN α/β aumentou na presença de p53, sugerindo um efeito sinérgico pró-apoptótico com implicações terapêuticas importantes. De certa maneira, nossos dados (**Figuras 10 e 13**), também indicam este efeito sinérgico pró-apoptótico entre essas vias, já que a p53 é transcricionalmente ativada após o tratamento da combinação p19Arf e IFN β , que resulta em uma maior porcentagem de células sub-G0 do que apenas o tratamento com p19Arf ou IFN β . Porém pelo ensaio clonogênico (**Figura 15**), o tratamento com IFN β não reduziu significativamente o número de colônias. Em contraste, tanto o tratamento com apenas p19Arf quanto o da combinação p19Arf e IFN β foram capazes de reduzir drasticamente esse número de colônias, indicando que *in vitro* o efeito da combinação está mais associado com a p19Arf do que com o IFN β . Adicionalmente, já foi observado que em algumas linhagens celulares, o efeito citostático dos IFNs tipo I não requer p19Arf ou p53, no entanto em outras linhagens a indução de apoptose requer p19Arf, mas não p53 (76).

A proteína Arf pode interagir fisicamente com mais de 25 outras proteínas, pelo menos, algumas das quais podem ser responsáveis pelas suas funções independentes de p53, como biogénese ribossomal, regulação da transcrição, a resposta de danos ao DNA, apoptose e autofagia. No entanto, especialmente no caso de apoptose o mecanismo induzido por Arf ainda não está claro. Por exemplo, já foi observado em culturas primárias derivadas de camundongos *knockout* para p53 que a resposta de Arf primeiramente ativou uma parada na fase S ou G2 e somente depois de sair do ciclo, entraram em apoptose (77). Recentemente, foi

observado que em células com p53 nulo a Arf pode induzir apoptose pela proteína pró-apoptótica Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*). A expressão de Arf induz uma mudança conformacional na porção N-terminal de Bak, mas não de Bax, o que permite a alteração na permeabilidade mitocondrial, liberação do citocromo c e a subsequente ativação das caspases e fragmentação do DNA (78).

Além disso, em células com p53 funcional já foi relatado que a indução de apoptose por Arf ocorre preferencialmente pela transativação da proteína pró-apoptótica Puma via p53, que acarreta na via de morte mitocondrial da proteína Bax (79).

A transferência *in situ* de um gene supressor de tumor associado com um gene imune modulador além de tornar as células mais susceptíveis à morte celular poderia também induzir uma resposta imune antitumoral para combater tanto as células transduzidas quanto as não transduzidas e possivelmente até células metastáticas. Dessa maneira, para investigar essa capacidade imuno estimulatória da combinação p19Arf e IFN β o objetivo deste estudo foi avaliar se células B16F10 tratadas com essa combinação são capazes de induzir uma resposta imune antitumoral em um modelo de vacinação profilática para melanoma murino.

No protocolo de vacinação a própria célula B16F10 tratada pela combinação p19Arf e IFN β é o agente vacinal, empregado para imunizar camundongos imunocompetentes contra um posterior desafio com células B16F10 *naïve*. Deste modo, caso o tratamento combinado fosse capaz de ativar uma resposta imune antitumoral o tumor do desafio teria seu desenvolvimento afetado por essa resposta.

O protocolo foi dividido em três etapas sequenciais: transdução, vacinação e desafio. Na primeira etapa, células B16F10 foram co-transduzidas *ex vivo* com os vetores AdPGIFN β e AdPGp19 e mantidas em cultura por 48 horas. Após esse período, essas células morrendo foram inoculadas três vezes, uma vez a cada sete dias, em camundongos imunocompetentes C57Bl/6 no flanco esquerdo (sítio da vacina) e sete dias após a última vacinação, na etapa do desafio, esses animais foram desafiados com células B16F10 *naïve*, injetadas no flanco direito (sítio do desafio). A progressão de tumor nestes dois sítios foi acompanhada.

A partir deste experimento (**Figura 14**) foi observado que no sítio da vacina essas células tratadas pela combinação formaram tumores mais tarde que o grupo que recebeu as células não tratadas. Notavelmente, nesse grupo que recebeu as células tratadas pela combinação foram feitas mais aplicações e inoculadas mais

células do que o outro grupo, e mesmo assim o tumor apareceu mais tarde. Além disso, uma vez estabelecidos esses tumores originados de células tratadas pela combinação p19Arf e IFN β também possuem uma progressão tumoral reduzida em comparação com os tumores originados de células não tratadas. No sítio do desafio, apenas a vacinação com células tratadas pela combinação reduziu o volume tumoral e diminui a progressão tumoral do desafio em relação aos grupos vacinados com PBS ou com células mortas e transduzidas com o vetor controle.

Com essas observações foi sugerido que a presença desse tumor do sítio da vacina poderia de algum modo influenciar no crescimento do tumor do sítio do desafio. Para averiguar isto, dias antes do desafio camundongos receberam respectivamente, células B16 *naïve* ou células B16 transduzidas pelo vetor controle AdPGLUC. Em ambos os experimentos (**Figuras 14 e 17**), foi observado que a progressão tumoral do desafio não foi diferente do que os animais que foram injetados com PBS ou com células mortas, indicando que neste modelo o crescimento do tumor do desafio não é afetado pela presença de um tumor no flanco contralateral. Entretanto, estes dados não descartam a possibilidade que algum tipo de modulação do sistema imune não esteja ocorrendo, seja pela secreção de substâncias imuno moduladoras, fornecimento de antígenos tumorais, pela atração de células mielóides e reguladores ou por outros mecanismos.

Para um protocolo de vacinação que utiliza células tumorais durante o processo de morte seria ideal que estas não formassem tumores no hospedeiro. Com essa finalidade a radiação gama foi associada ao tratamento (**Figura 8**) e mesmo assim os tumores se desenvolveram (**Tabela 6**). Muitos trabalhos demonstram que a radiação (UVB, UVC ou gama) é capaz de modular a imunogenicidade de células irradiadas. Como por exemplo, a radiação gama induz a liberação de ATP, por receptor P2X7 (80), aumenta a geração de antígenos tumorais e o tráfico de células imuno efetoras dentro do tumor (81) e induz a secreção de IFN γ no microambiente tumoral (82). Matheoud e colaboradores, mostram que células dendríticas em contato com células B16F10 tratadas com radiação gama passavam a secretar maiores níveis de citocinas tolerogênicas como a IL-10 e menores níveis de citocinas imuno efetoras como a IL12p70. Deste modo, a associação da radiação gama pode ser usada para aumentar a imunogenicidade das células ou como um tratamento adicional para conferir maior segurança ao protocolo de vacinação, mas

como o objetivo deste trabalho foi estudar as propriedades imuno estimulatórias apenas da combinação p19Arf e IFN β não seria adequado associar a radiação (83).

Assim, utilizando apenas a transdução como tratamento, o MOI dos vetores AdPGIFN β IRESp19, AdPGIFN β e AdPGP19 foi otimizado para aumentar o número de células mortas pela combinação (**Figura 13**). Supunha-se que células viáveis com potencial de gerar tumor poderiam ser inoculadas e gerar os tumores caso a transdução não ocorresse corretamente durante o preparo das 3 vacinações. Entretanto, mesmo após a indução de morte celular pelo tratamento otimizado da combinação p19Arf com IFN β os animais desenvolveram tumores (**Figura 14 e Tabela 10**), isto sugere que na linhagem B16mCAR, modificada para expressar o receptor murino do adenovírus, possivelmente algum clone ou população celular não foi ou não pode ser eficientemente transduzidas ou possui algum tipo de resistência contra tratamento da combinação.

Dessa maneira, foram investigadas nos três seguintes experimentos as possíveis causas para o desenvolvimento de tumor no sítio da vacina. O primeiro, analisou através do ensaio clonogênico a resistência à morte celular da linhagem B16F10 ao tratamento com os vetores AdPGLUC, AdPGp19, AdPGIFN β ou à combinação do vetor AdPGp19 com AdPGIFN β (**Figura 15 A e B**). O segundo, investigou *in vivo* por qual desses tratamentos o desenvolvimento de tumor é mais afetado (**Figura 15 D**) e o terceiro avaliou a influência do número de células e de aplicações no desenvolvimento de tumor a partir de células B16F10 tratadas pela combinação p19Arf e IFN β (**Figura 15 E**).

No ensaio clonogênico constatou-se que tanto o tratamento com p19Arf quanto com a combinação p19Arf e IFN β diminuem drasticamente o número de colônias formadas (**Figura 15 A e B**). Essas colônias podem indicar quantas células viáveis estão sendo inoculadas nos camundongos no momento da vacinação. É importante ressaltar que o ensaio clonogênico também pode ser usado para verificar se adesão celular foi alterado após o tratamento, e que dessa maneira, outros testes precisam ser feitos para desacatar o envolvimento da adesão na redução no número de colônias.

Quando essas células transduzidas foram inoculadas em camundongos imunocompetentes somente com a combinação não houve desenvolvimento do tumor, sendo que os animais que receberam células tratadas apenas com IFN β permaneceram por mais tempo livres de tumor do que os que foram injetados com

células não tratadas ou tratadas só pela p19Arf, indicando que *in vivo* o efeito antitumoral da combinação é mais dependente do IFN β do que da p19Arf.

Adicionalmente, também foi observado que células tratadas pela combinação p19Arf e IFN β tendem a não formar tumores quando aplicadas em uma única dose, mesmo variando a quantidade injetada. Porém quando essa mesma quantidade de células foi inoculada em doses fracionadas a formação de tumor foi observado, sendo que estes tumores tendem a aparecer mais rapidamente quando são administradas mais células por aplicação. Dessa forma, a formação de tumores a partir de células tratadas pela combinação está associada com o número células e de aplicações usadas durante a vacinação. O impacto da presença do tumor no sítio do desafio e desenvolvimento de métodos para sua eliminação são assuntos interessantes para ensaios futuros.

Para averiguar o envolvimento do sistema imune na rejeição desses tumores, originados no sítio da vacina a partir de células tratadas só com IFN β ou com a combinação, foi realizado um protocolo de imunossupressão com dexametasona. Assim, na presença do sistema imune atenuado as células que estavam sob o controle imunológico poderiam formar tumores **(Figura 19)**. O desenvolvimento tumoral foi alterado pela imunossupressão com a dose de 10mg/kg/dia de dexametasona nos grupos IFN β e p19+IFN β , desenvolvendo tumores em todos os animais do grupo IFN β e em 40% do grupo da combinação **(Figura 19 D)**. Essa diferença entre esses grupos sugere que o principal mecanismo antitumoral das células tratadas com IFN β seja a ativação de uma resposta imune antitumoral e que as células tratadas com combinação também podem ativar essa resposta, mas que outros mecanismos antitumorais também estão envolvidos, possivelmente, a indução de morte celular. O protocolo de imunossupressão revelou que o sistema imunológico está envolvido na proteção antitumoral das células tratadas com IFN β ou com a combinação.

No trabalho de Keil e colaboradores em 2012, o tratamento de camundongos B6C3F₁ com dexametasona (sc) por 16 dias consecutivos acarretou na redução significativa: (1) da atividade lítica de células NK; (2) da produção de óxido nítrico por macrófagos; (3) da citotoxicidade do Linfócito T CD8+; (4) do número de linfócitos no sangue periférico e (5) das subpopulação CD4/CD8 no timo e baço. Assim como no nosso trabalho também foi observado a redução do número de linfócitos e o aumento de neutrófilos e do número de células de células brancas totais. Essas

alterações nos parâmetros de resposta imune foram intensificadas com o aumento da dosagem, sendo maiores com 30 mg/kg/dia, seguida por 10mg/kg/dia e menores com 3mg/kg/dia. De modo que somente nas doses de 30 e 10mg/kg/dia o hospedeiro ficou menos resistente contra as células B16F10 injetadas na veia cauda em um modelo murino de metástase (84). Entretanto, no nosso estudo os camundongos que foram inoculados (sc) com células B16F10 transduzidas com o vetor controle não tiveram a progressão alertada pela imunossupressão, mesmo com a dose de 10mg/kg/dia.

No mesmo trabalho também foram estudados os efeitos de outro imunossupressor, a ciclosporina A, que diminui muitos parâmetros de resposta imunológicos, mas ao contrário da dexametasona, aumentou a atividade lítica das células NK e da produção de óxido nítrico por macrófagos. Além disso, foi observado que a imunossupressão com ciclosporina A não reduziu a resistência do hospedeiro contra B16F10 em nenhuma das doses estudadas (84). Os autores argumentaram que como a ciclosporina A aumentou a atividade das células NK, os camundongos não tiveram sua resistência contra as células B16F10 atenuada, pois já foi sugerido que o principal mecanismo imune contra essas células seja mediado pelas células NK (85).

O tempo de meia vida da dexametasona é de 5,5 horas em ratos (86) e em camundongos é tipicamente a metade do tempo (87). Deste modo é provável que os efeitos imunossupressores foram maiores durante o período de tratamento e que sistema imune foi pelo menos parcialmente restabelecido após o fim do tratamento. Assim, como as células foram inoculadas após 8 dias de tratamento e seguidas por mais 10 injeções, é possível que este protocolo tenha criado apenas uma oportunidade para que as células escapassem do controle imunológico, em vez de crescerem em um ambiente imuno deficiente, como camundongos *Nudes* ou *knockouts* para o gene Rag2.

No sítio do desafio, após a vacinação com células tratadas pela combinação p19Arf e IFN β , a redução da progressão tumoral foi observada de maneira robusta nos diversos protocolos realizados neste estudo (**Figuras 12 e 14**). As células B16F10 foram tratadas pelo vetor bicistrônico ou pela co-transdução dos monocistrônicos AdPGp19 e AdPGIFN β , inoculadas uma, duas ou três vezes com diferentes quantidades de células por aplicação (10^5 , 3×10^5 , $3,3 \times 10^5$, 5×10^5), e mesmo assim a proteção antitumoral foi observada. Porém quando foram inoculadas

apenas 10^4 ou 5×10^4 células essa proteção foi perdida, o que indica que o número de células usadas na vacinação pode determinar o sucesso da vacinação.

A robustez na proteção antitumoral também foi demonstrada pela duração da proteção antitumoral conferida pela vacinação foi averiguada (**Figura 16**). Os camundongos eram usualmente desafiados 7 dias após a última vacinação, mas neste experimento eles foram desafiados, 73 dias após a vacinação e mesmo assim a proteção antitumoral foi mantida. Além disso, foi indicado que apenas a dose *boost* com 5×10^4 células não foi responsável pela redução da progressão tumoral observada, já que os camundongos que foram vacinados com 5×10^4 células e que também receberam a dose *boost* falharam em responder ao desafio.

A influência da p19Arf e do IFN β na proteção antitumoral induzida pela combinação p19Arf e IFN β também foi avaliada, os camundongos foram vacinados de modo que a formação de tumor no sítio da vacina fosse retardada ou eliminada na maior parte dos animais e ainda assim fosse mantida a proteção antitumoral já observada. Para isso tanto o número de células quando o de aplicações foi reduzido, sendo a primeira dose denominada *boost* por conter menos células que a segunda dose, denominada vacina. Assim, o *prime* deveria ativar uma resposta imune antitumoral e a subsequente vacina deveria fortalecer essa resposta. Essa estratégia de vacinação mostra ter alcançado o objetivo já que no sítio da vacina os tumores do grupo p19+IFN β apareceram em uma menor porcentagem do que quando os animais recebiam 3 doses iguais de vacinação (**Figura 17**).

No sítio do desafio, os grupos vacinados com células tratadas só por IFN β ou pela combinação a progressão tumoral foi reduzida de maneira similar, não havendo diferença significativa entre estes dois grupos, e como a vacinação com células tratadas pela p19Arf não mostrou um resultado significativo no desafio, a proteção tumoral da combinação aparenta ser mais dependente do IFN β .

Em paralelo com este estudo, a capacidade da combinação p19Arf e IFN β de estimular uma resposta imune antitumoral também foi investigada pelo nosso grupo em um modelo murino de terapia gênica *in situ* com a linhagem murina de carcinoma de pulmão LLC-1, considerada como não imunogênica, foi utilizada por responder *in vitro* a combinação. Neste modelo, tumores subcutâneos foram formados no flanco esquerdo de camundongos imunocompetentes C57Bl/6 e tratados por duas semanas com injeções intratumorais de vetores adenovirais portadores de GFP, p19Arf, IFN β ou da combinação p19Arf e IFN β . Apenas os grupos tratados com IFN β ou com a

combinação tiveram a progressão tumoral significativamente reduzida e a sobrevida prolongada. Entretanto, no mesmo cenário quando um desafio secundário foi feito no flanco contra lateral desses camundongos injetando novas células LLC, somente os camundongos que tiveram o tumor primário tratado com a combinação, p19Arf e IFN β , apresentaram um notável efeito de proteção antitumoral (88).

Além disso, em outro experimento o protocolo de terapia gênica foi repetido em camundongos *Nudes* imunodeficientes e os tumores tratados com IFN β ou com a combinação não tiveram mais sua progressão reduzida, indicando que o efeito antitumoral foi perdido e que estes efeitos antitumorais são dependentes do sistema imune adaptativo (88).

Hipotetiza-se que os efeitos imuno estimulatórios da combinação p19Arf e IFN β no sistema imunológico ocorram devido: (1) a expressão de IFN β e de outras citocinas inflamatórias; (2) fornecimento de antígenos tumorais e (3) secreção de moléculas associadas à morte celular - CDAM (*Cell Death Associated Molecules*). A ativação transcricional da p53 também pode ser outro diferencial da combinação, já que a p53 pode modular positivamente a imunogenicidade da célula pelo aumento do ligante de células NK (NKG2D) (89). Além disso, supõe-se que soma desses fatores induzidos pela combinação poderia ser superior aos estímulos emitidos pelas células tratadas somente com IFN β e conseqüentemente induzir uma resposta imune mais efetiva.

Entretanto, essa possível maior estimulação imunológica da combinação ainda não está clara, já que a regressão tumoral nos animais vacinados com células tratadas com IFN β ou com a combinação foi similar. Uma explicação para esse resultado seria a cinética diferenciada de expressão do IFN β , pois como as células tratadas pela combinação morrem a expressão de IFN β seria cessada. Já como as células tratadas somente com vetor AdPIFN β não morrem, ou morrem em uma menor porcentagem do que a combinação, e ainda *in vivo* permanecem sob o controle do sistema imunológico sem formar tumores, a expressão de IFN β ocorreria por mais tempo. Deste modo, poderia ser interessante investigar a duração de expressão destes vetores *in vivo* e se este período de expressão tem influência no protocolo de vacinação e no crescimento do desafio.

Dados recentes também demonstram que o modo como a célula morre pode ser um fator determinante para o sucesso da terapia. Dependendo do agente de tratamento e do mecanismo de morte celular induzido, a célula tumoral pode morrer

de uma maneira imunogênica, induzindo uma forte e específica resposta imunológica contra as outras células tumorais existentes. Como por exemplo, a morte por apoptose que foi usualmente descrita como um processo de morte celular tolerogênico para o sistema imunológico pode em algumas circunstâncias, como por exemplo sob o tratamento de antraciclinas, se tornar imunogênica e induzir uma resposta antitumoral eficiente pelo via de das células dendríticas, células T e do IFN γ (90).

Este mecanismo de morte celular imunogênico pode influenciar o resultado das terapias antitumorais e ocorre quando células que estão morrendo sofrem alterações nas características da superfície celular e liberam ao ambiente extracelular, moléculas de sinalização de morte celular (CDAM) como a calreticulna, ATP e HMGB1. Essas moléculas co-estimulatórios são capazes de se ligar receptores das células dendríticas e fornecer estímulos necessários para uma maturação efetiva dessas células apresentadoras de antígenos. Estas agora, maduras, migram até os linfonodos drenantes e ativam uma resposta imunológica CD4⁺ e CD8⁺ contra as células tumorais, superando assim, os sinais imunossupressores das células tumorais (91).

A observação de que a combinação p19Arf e IFN β foi capaz de induzir uma proteção antitumoral forte o suficiente para reduzir a progressão tumoral de um tumor agressivo como o melanoma murino B16F10 pode ser considerada como um resultado interessante. Já que essa linhagem possui características importantes que se assemelham com os melanomas humanos, como a baixa imunogenicidade, alta agressividade e é considerada por muitos autores como um modelo adequado de desenvolvimento para novas terapias antitumorais (92).

O potencial de uma imunoterapia com células de melanoma B16F10 em conjunto com IFN β já vem sendo demonstrado por outros grupos de pesquisa. Feischmann e colaboradores (2001) trataram células de B16F10 *in vitro* por 2 semanas com IFN α e conseguiram induzir uma proteção imunológica em 50% dos animais desafiados ao melanoma. Também conseguiram em 67% impedir o desenvolvimento de metástases e curar 40% dos camundongos. A elucidação celular desse mecanismo foi atribuída à capacidade dos macrófagos em processar os antígenos e pela produção de citocinas imuno estimulatórias (IL-12), mas principalmente, pela função citotóxica dos linfócitos CD8⁺ em combater as células tumorais. Entretanto, o mecanismo molecular pelo qual o IFN α modificou as células

B16F10 e induziu a imunidade não foi estudado. Já que o IFN α / β compartilham os mesmos receptores de IFN do tipo I, é possível que o IFN α possa ser substituído pelo IFN β (93).

Pesquisas de B1610 com IFN α demonstram que, assim como os melanomas humanos, também é necessário um longo período de tratamento com IFN α para aumentar a sua capacidade imunogênica (94). Desta forma, a utilização de um vetor viral que expresse altos níveis de IFN β , como o utilizado neste trabalho, pode se uma estratégia promissora para gerar essa capacidade imunogênica de uma maneira mais eficiente.

CONCLUSÃO

Os dados apresentados indicam que: (i) *in vitro*, o efeito antitumoral da combinação p19Arf e IFN β está mais relacionado com a reposição de p19Arf do que com a expressão de IFN β , (ii) e *in vivo*, na presença do sistema imunológico, a inibição tumoral parece ser mais dependente do IFN β . (iii) Porém, com o tratamento combinado de p19Arf com IFN β , esses efeitos antitumorais mostraram-se mais pronunciados, possivelmente por associar imune estimulação e morte celular, (iv) induzindo após a vacinação uma forte e prolongada proteção antitumoral e maior sobrevida aos animais tratados.

Dessa maneira, conclui-se que a aplicação de células tratadas pela combinação p19Arf e IFN β , como um agente vacinal, pode gerar uma oportunidade de associar morte celular e imune estimulação, e assim, ser uma estratégia efetiva para o tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

---

1. Research I-IAfC. <http://www.iarc.fr/2010>.
2. INCA - Instituto Nacional de Câncer <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/2012> [cited 2012 2012].
3. DeVita VT, Rosenberg SA. Two hundred years of cancer research. *N Engl J Med*. 2012;366(23):2207-14.
4. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(3):215-33.
5. Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy--revisited. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(8):591-600.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
8. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-9.
9. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(3):319-26.
10. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
11. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.
12. Tarhini AA, Kirkwood JM. Clinical and immunologic basis of interferon therapy in melanoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1182:47-57.
13. Berinstein NL. Strategies to enhance the therapeutic activity of cancer vaccines: using melanoma as a model. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1174:107-17.
14. Weinert BT, Krishnadath KK, Milano F, Pedersen AW, Claesson MH, Zocca MB. Real-time PCR analysis of genes encoding tumor antigens in esophageal tumors and a cancer vaccine. *Cancer Immun*. 2009;9:9.
15. Schadendorf D, Paschen A, Sun Y. Autologous, allogeneic tumor cells or genetically engineered cells as cancer vaccine against melanoma. *Immunol Lett*. 2000;74(1):67-74.
16. Ilett EJ, Prestwich RJ, Melcher AA. The evolving role of dendritic cells in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(3):369-79.
17. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(5):411-22.
18. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-23.
19. Robson NC, Hoves S, Maraskovsky E, Schnurr M. Presentation of tumour antigens by dendritic cells and challenges faced. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(1):137-44.
20. Hashemi SM, Hassan ZM, Soudi S, Ghazanfari T, Kheirandish M, Shahabi S. Evaluation of anti-tumor effects of tumor cell lysate enriched by HSP-70 against fibrosarcoma tumor in BALB/c mice. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(7):920-7.
21. Sondak VK, Sosman JA. Results of clinical trials with an allogenic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine. *Semin Cancer Biol*. 2003;13(6):409-15.

22. Jinushi M, Tahara H. Cytokine gene-mediated immunotherapy: current status and future perspectives. *Cancer Sci*. 2009;100(8):1389-96.
23. Kowalczyk DW, Wysocki PJ, Mackiewicz A. Cancer immunotherapy using cells modified with cytokine genes. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(3):613-24.
24. ISAACS A, LINDENMANN J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1957;147(927):258-67.
25. Gresser I, Bourali C, Lévy JP, Fontaine-Brouty-Boyé D, Thomas MT. Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969;63(1):51-7.
26. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):836-48.
27. Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, Koebel C, Uppaluri R, Bui J, et al. Interferon-gamma and cancer immunoediting. *Immunol Res*. 2005;32(1-3):231-45.
28. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(5):375-86.
29. Sato M, Taniguchi T, Tanaka N. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors -- studies from gene knockout mice. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;12(2-3):133-42.
30. de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol*. 2001;69(6):912-20.
31. Chen W, Royer WE. Structural insights into interferon regulatory factor activation. *Cell Signal*. 2010;22(6):883-7.
32. Rani MR, Ransohoff RM. Alternative and accessory pathways in the regulation of IFN-beta-mediated gene expression. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25(12):788-98.
33. Sin WX, Li P, Yeong JP, Chin KC. Activation and regulation of interferon- β in immune responses. *Immunol Res*. 2012;53(1-3):25-40.
34. Lamken P, Lata S, Gavutis M, Piehler J. Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers. *J Mol Biol*. 2004;341(1):303-18.
35. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8(3):237-49.
36. Subramaniam PS, Cruz PE, Hobeika AC, Johnson HM. Type I interferon induction of the Cdk-inhibitor p21WAF1 is accompanied by ordered G1 arrest, differentiation and apoptosis of the Daudi B-cell line. *Oncogene*. 1998;16(14):1885-90.
37. Tiefenbrun N, Melamed D, Levy N, Resnitzky D, Hoffman I, Reed SI, et al. Alpha interferon suppresses the cyclin D3 and cdc25A genes, leading to a reversible G0-like arrest. *Mol Cell Biol*. 1996;16(7):3934-44.
38. Decker T, Müller M, Stockinger S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(9):675-87.
39. González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):125-35.
40. Ruuth K, Carlsson L, Hallberg B, Lundgren E. Interferon-alpha promotes survival of human primary B-lymphocytes via phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(3):583-6.
41. Oka H, Hirohata S. Regulation of human B cell responsiveness by interferon-alpha: interferon-alpha-mediated suppression of B cell function is reversed through

- direct interactions between monocytes and B cells. *Cell Immunol.* 1993;146(2):238-48.
42. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* 1995;83(6):993-1000.
43. Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer.* 2010;127(10):2239-47.
44. Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(9):663-73.
45. Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ, et al. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature.* 2001;413(6851):86-91.
46. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell.* 1997;91(5):649-59.
47. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell.* 2009;137(4):609-22.
48. Llanos S, Clark PA, Rowe J, Peters G. Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol.* 2001;3(5):445-52.
49. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature.* 1992;358(6381):80-3.
50. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* 2000;60(1):129-33.
51. Pinyol M, Hernández L, Martínez A, Cobo F, Hernández S, Beà S, et al. INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type p53 gene. *Am J Pathol.* 2000;156(6):1987-96.
52. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol.* 1999;1(1):20-6.
53. Saporita AJ, Maggi LB, Apicelli AJ, Weber JD. Therapeutic targets in the ARF tumor suppressor pathway. *Curr Med Chem.* 2007;14(17):1815-27.
54. Eymin B, Claverie P, Salon C, Leduc C, Col E, Brambilla E, et al. p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol.* 2006;26(11):4339-50.
55. Reef S, Zalckvar E, Shifman O, Bialik S, Sabanay H, Oren M, et al. A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol Cell.* 2006;22(4):463-75.
56. Abida WM, Gu W. p53-Dependent and p53-independent activation of autophagy by ARF. *Cancer Res.* 2008;68(2):352-7.
57. 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;252(5013):1708-11.
58. el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1992;1(1):45-9.
59. Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol.* 1992;12(6):2866-71.
60. 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;12(12):935-46.

61. Strauss BE, Costanzi-Strauss E. pCLPG: a p53-driven retroviral system. *Virology*. 2004;321(2):165-72.
62. Bajgelman MC, Strauss BE. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. *Virology*. 2008;371(1):8-13.
63. MERKEL CAM, R.F.V. BARAUNA, V. STRAUSS, B.E. Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo. (Manuscript submitted).
64. 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.
65. Gomez-Lazaro M, Fernandez-Gomez FJ, Jordán J. p53: twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *J Physiol Biochem*. 2004;60(4):287-307.
66. el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol*. 1998;8(5):345-57.
67. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res*. 1994;54(12):3131-5.
68. Takaoka A, Taniguchi T. New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. *Cancer Sci*. 2003;94(5):405-11.
70. Schambach A, Wodrich H, Hildinger M, Bohne J, Kräusslich HG, Baum C. Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther*. 2000;2(5):435-45.
71. BAJGELMAN MCM, R.F.V. CARVALHO, A.C.P.V. STRAUSS, B.E. AAVPG: A vigilant vector where transgene expression is induced by p53. (Manuscript submitted).
72. Zuckerman V, Wolyniec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol*. 2009;219(1):3-15.
73. Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(5):414-20.
74. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003;22(56):9030-40.
75. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 2003;11(3):577-90.
76. 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;279(31):32275-80.
77. Eymin B, Leduc C, Coll JL, Brambilla E, Gazzeri S. p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene*. 2003;22(12):1822-35.
78. Mürer A, Overkamp T, Gillissen B, Richter A, Pretzsch T, Milojkovic A, et al. p14(ARF)-induced apoptosis in p53 protein-deficient cells is mediated by BH3-only protein-independent derepression of Bak protein through down-regulation of Mcl-1 and Bcl-xL proteins. *J Biol Chem*. 2012;287(21):17343-52.
79. Hemmati PG, Güner D, Gillissen B, Wendt J, von Haefen C, Chinnadurai G, et al. Bak functionally complements for loss of Bax during p14ARF-induced mitochondrial apoptosis in human cancer cells. *Oncogene*. 2006;25(50):6582-94.

80. Ohshima Y, Tsukimoto M, Takenouchi T, Harada H, Suzuki A, Sato M, et al. gamma-Irradiation induces P2X(7) receptor-dependent ATP release from B16 melanoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(1):40-6.
81. Sorensen EW, Gerber SA, Frelinger JG, Lord EM. IL-12 suppresses vascular endothelial growth factor receptor 3 expression on tumor vessels by two distinct IFN-gamma-dependent mechanisms. *J Immunol*. 2010;184(4):1858-66.
82. Lugade AA, Moran JP, Gerber SA, Rose RC, Frelinger JG, Lord EM. Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J Immunol*. 2005;174(12):7516-23.
83. Matheoud D, Baey C, Vimeux L, Tempez A, Valente M, Louche P, et al. Dendritic cells crosspresent antigens from live B16 cells more efficiently than from apoptotic cells and protect from melanoma in a therapeutic model. *PLoS One*. 2011;6(4):e19104.
84. Keil D, Luebke RW, Pruett SB. Quantifying the relationship between multiple immunological parameters and host resistance: probing the limits of reductionism. *J Immunol*. 2001;167(8):4543-52.
85. Wu WJ, Pruett SB. Ethanol decreases host resistance to pulmonary metastases in a mouse model: role of natural killer cells and the ethanol-induced stress response. *Int J Cancer*. 1999;82(6):886-92.
86. Varma DR, Mulay S. Anti-inflammatory and ulcerogenic effects and pharmacokinetics of dexamethasone in protein-deficient rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1980;214(1):197-202.
87. Mordenti J. Man versus beast: pharmacokinetic scaling in mammals. *J Pharm Sci*. 1986;75(11):1028-40.
88. Medrano R, Ribeiro A, Catani J. Manuscript in preparation.
89. Textor S, Fiegler N, Arnold A, Porgador A, Hofmann TG, Cerwenka A. Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Res*. 2011;71(18):5998-6009.
90. Locher C, Conforti R, Aymeric L, Ma Y, Yamazaki T, Rusakiewicz S, et al. Desirable cell death during anticancer chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1209:99-108.
91. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, Schlemmer F, Adjemian S, Michaud M, et al. Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30(1):61-9.
92. Wu TY, Fleischmann WR. Murine B16 melanoma vaccination-induced tumor immunity: identification of specific immune cells and functions involved. *J Interferon Cytokine Res*. 2001;21(12):1117-27.
93. Sakurai F, Terada T, Maruyama M, Watanabe Y, Yamashita F, Takakura Y, et al. Therapeutic effect of intravenous delivery of lipoplexes containing the interferon-beta gene and poly I: poly C in a murine lung metastasis model. *Cancer Gene Ther*. 2003;10(9):661-8.
94. Donawho C, Evans R, Kripke ML. Immunobiology of primary murine melanomas. *J Immunother* (1991). 1992;12(3):187-93.

ANEXO I – Comprovante de Aprovação pelo Comitê de Ética

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03.11.2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 247/10 intitulado: **"Utilização do IFN-beta e da via p53/Arf na elaboração de uma nova imunoterapia para melanoma Ruan Felipe"**, apresentado pelo Departamento de Radiologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Bryan Eric Strauss

Pesquisador (a) Executante: Ruan Felipe Vieira Medrano

CEP-FMUSP, 03 de novembro de 2010.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO II – Curriculum Vitae

Ruan Felipe Vieira Medrano

Formação acadêmica/titulação

- 2010** Mestrado em Oncologia.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Utilização do Interferon-beta e da via p53/Arf na elaboração de uma nova imunoterapia para melanoma
Orientador: Dr. Bryan Eric Strauss
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2006 - 2009** Graduação em Biomedicina.
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Araras, Brasil
Título: Desenvolvimento da técnica tetra-primer ARMS-PCR para genotipagem de SNPs (single nucleotide polymorphism) no gene da conexina 26
Orientadora: Dra. Camila Andréa de Oliveira
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Quantificação da Expressão Gênica: Métodos avançados.
Life Technollgies, LIFE TECHNOLOGIE, Brasil
- 2009 - 2009** Habilitação em Análises Clínicas.
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Araras, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Epigenetics and Cancer.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Introdução a Modelagem Molecular.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirão Preto, Brasil
- 2009 - 2009** Habilitação em Biologia Molecular.
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Araras, Brasil
- 2009 - 2009** Extensão universitária em II Curso de Inverno de Genética.
Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Análise do Padrão de Metilação em Ilhas CpGs.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em PCR, RT-PCR e PCR em tempo real.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Farmacogenética Aplicada.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em V Curso de Verão: Manipulação de Ácidos Nucléicos.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Mapeamento Genético.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em Práticas laboratoriais em Genética e B. Molecular.
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Araras, Brasil

2007 - 2007	Extensão universitária em Aplicações de Enzimas no Laboratório Clínico. Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Araras, Brasil
2007 - 2007	Extensão universitária em Capacitação em RH em Biologia Molecular Bioquímica. Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Araras, Brasil
2007 - 2007	Extensão universitária em Fundamentos da Imunologia. Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Araras, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Perfil Genético de Alta Resolução em Tumores. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

---

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2010 - Atual	Pós Graduação , Enquadramento funcional: Aluno de Mestrado , Carga horária: 40,
2010 - 2010	Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário do Setor de Vetor de Virais

---

Atividades

10/2010 - 2012	Representante Discente da Pós-graduação em Oncologia
07/2010 - Atual	Pesquisa e Desenvolvimento, Linhas de pesquisa: Terapia Gênica do Câncer

2. Centro Universitário Herminio Ometto de Araras - UNIARARAS

Vínculo institucional

2008 - 2009	Centro Acadêmico , Enquadramento funcional: Vice-Presidente.
2008 - 2010	Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Bolsista PIBIC de Iniciação Científica.
2008 - 2009	Centro Acadêmico , Enquadramento funcional: Diretor Científico .
2007 - 2007	Monitor , Enquadramento funcional: Monitor de Genética.
2007 - 2007	Monitor , Enquadramento funcional: Monitor Bioquímica

---

Atividades

08/2009 - 12/2009	Estágio Supervisionado de Biologia Molecular - Habilitação em Biologia Molecular
02/2009 - 06/2009	Estágio Supervisionado de Análises Clínicas - Habilitação em Análises Clínicas

07/2008 - 01/2010 Pesquisa e Desenvolvimento,

Linhas de pesquisa:

Bases Moleculares de genes envolvidos nas vias de comunicação intercelular ,

Estudos aplicados no controle e prevenção de agravos à saúde

04/2007 - 06/2008 Extensão Universitária,

Coordenador Grupo de Estudos em Genética, Biologia Celular e Molecular (G.E.A)

3. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

2008 - 2008 Estagiário , Enquadramento funcional: Biomédico.

Prêmios e títulos

2011	Menção Honrosa, Induction of cell death by p19Arf and IFN-beta in tumor cells resistant tp p53 gene therapy, 4º Simpósio de Imunobiologia de Tumores da Universidade Estadual Paulista - UNESP
2007	Menção Honrosa, Avaliação in vitro da atividade antioxidante de componentes da dieta, 2º Congresso Científico Uniararas - 1º Congresso de Iniciação Científica PIBIC - CNPQ, Uniararas

Produção bibliográfica

Artigos submetidos

1. MEDRANO, R.F.V. OLIVEIRA, C.A. **A practical guide for the tetra-primer ARMS-PCR technique development.** The Journal of Biomolecular Techniques.
2. BAJGELMAN, M.C. MEDRANO, R.F.V. CARVALHO, A.C.P.V. STRAUSS, B.E. **AAVPG: A vigilant vector where transgene expression is induced by p53.** Virology.
3. MERKEL, C.A. MEDRANO, R.F.V. BARAUNA, V. STRAUSS, B.E. **Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo.** Cancer Gene Therapy.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **MEDRANO, R. F. V., RIBEIRO, A. H., CATANI, J. P. P., STRAUSS, B. E.**
Enhanced anti-tumor immune response upon combined treatment with p19arf and IFN-beta is revealed in murine cancer vaccine and gene therapy models In: Death Danger Inflammation and Immunity, 2012, Paris.
Abstracts book. , 2012. v.1. p.56 - 56
2. **MEDRANO, R. F. V., STRAUSS, B. E.**
Combining cell death and immune stimulation using p19Arf and IFN-beta in a B16F10 tumor vaccine model In: International Cell Death Society presents, 2011, Cheiro do mato-SP.
International cell death society 2001 abstract book. , 2011.
3. **MEDRANO, R. F. V., RIBEIRO, A. H., CATANI, J. P. P., STRAUSS, B. E.**
Induction of cell death by p19Arf and IFN-beta in tumor cells resistant to p53 gene therapy In: 4º Simpósio de Imunobiologia de Tumores da Unesp, 2011, Botucatu-SP.
Annual Reviews Biomed Sci 2011;13:A23.. , 2011. v.13.

4. **MEDRANO, R. F. V., OLIVEIRA, C. A.**

Genotipagem do SNP rs3751385 no gene da conexina 26 pela técnica tetra-primer ARMS-PCR In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. , 2009. p.318 - 318

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **MEDRANO, R. F. V., OLIVEIRA, C. A.**

Investigação de Polimorfismos de Base Única (SNPs) no gene da conexina 26 pela técnica tetra-primer ARMS-PCR In: 4º Congresso Científico Uniararas - 3º Congresso de Iniciação Científica PIBIC-CPNQ, 2009, Araras.

Anais do IV Congresso Científico, III Congresso de Iniciação Científica PIBIC – CNPq, I Apresentação dos Projetos de Extensão – Uniararas e I Apresentação dos Trabalhos do Ensino à distância (EAD). , 2009. v.3. p.153 - 158

2. **SOUZA, B. B., MEDRANO, R. F. V., OLIVEIRA, C. A.**

Aplicações do RNA de Interferência na Medicina In: 3º Congresso Científico Uniararas - 2º Congresso de Iniciação Científica PIBIC-CPNQ e The First Meeting On Aging, 2008, araras.

Aplicações do RNA de Interferência na Medicina. , 2008. v.03. p.296 - 299

3. **MEDRANO, R. F. V., COLLIN, G., PEREIRA, F.D.C, DA SILVA, J. T.P, OLIVEIRA, C. A., AGUIAR, G.D.C**

Perfil de Saúde da População Idosa Residente Em Asilos e Casas de Repouso do Município de Araras (SP) In: 3º Congresso Científico Uniararas - 2º Congresso de Iniciação Científica PIBIC-CPNQ e The First Meeting On Aging, 2008, araras.

População Idosa Residente Em Asilos e Casas de Repouso do Município de Araras (SP). , 2008. v.03. p.417 - 420

4. **MEDRANO, R. F. V., SOUZA, B. B., OLIVEIRA, C. A.**

RNA de Interferência:Novo Mecanismo de Silenciamento Gênico In: 3º Congresso Científico Uniararas - 2º Congresso de Iniciação Científica PIBIC-CPNQ e The First Meeting On Aging, 2008, araras.

RNA de Interferência:Novo Mecanismo de Silenciamento Gênico. , 2008. v.3. p.394 - 397

5. **MEDRANO, R. F. V., DELPHINO, F. F., PIGOSO, A. A.**

Avaliação in vitro da atividade antioxidante de componentes da dieta In: 2º Congresso Científico Uniararas - 1º Congresso de Iniciação Científica PIBIC - CNPQ, 2007, Araras.

2º Congresso Científico Uniararas - 1º Congresso de iniciação científica PIBIC - CNPQ. Araras: , 2007. v.2. p.99 - 101

Apresentação de trabalho e palestra

1. **MEDRANO, R. F. V., RIBEIRO, A. H., CATANI, J. P. P., STRAUSS, B. E.**

Enhanced anti-tumor immune response upon combined treatment with p19arf and IFN-beta is revealed in murine cancer vaccine and gene therapy models, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. **MEDRANO, R. F. V., STRAUSS, B. E.**

Combining cell death and immune stimulation using p19Arf and IFN-beta in a B16F10 tumor vaccine model, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

3. **MEDRANO, R. F. V., RIBEIRO, A. H., CATANI, J. P. P., STRAUSS, B. E.**

Induction of cell death by p19Arf and IFN-beta in tumor cells resistant to p53 gene therapy, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

4. **MEDRANO, R. F. V.**

Manipulando o sistema imunológico para o tratamento do câncer: conceitos e aplicações, 2011. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

5. MEDRANO, R. F. V.

Utilização de Vetores Virais para o desenvolvimento de imunoterapias do câncer, 2010. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

6. MEDRANO, R. F. V., OLIVEIRA, C. A.

Genotipagem do SNP rs3751385 no gene da conexina 26 pela técnica tetra-primer ARMS-PCR, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

7. MEDRANO, R. F. V., OLIVEIRA, C. A.

Investigação de Polimorfismos de Base Única (SNPs) no gene da conexina 26 pela técnica tetra-primer ARMS-PCR, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

8. MEDRANO, R. F. V., OLIVEIRA, C. A.

Polimorfismos de base única (SNPs) no gene da Conexina 26 e a deficiência auditiva, 2009. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

9. SOUZA, B. B., MEDRANO, R. F. V., OLIVEIRA, C. A.

Aplicações do RNA de interferência na Medicina, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

10. MEDRANO, R. F. V., COLLIN, G., PEREIRA, F.D.C, DA SILVA, J. T.P, Camila Andrea de Oliveira, AGUIAR, G.D.C

Perfil de Saúde da População Idosa Residente em Asilos e Casas de Repouso do Município de Araras (SP), 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

11. MEDRANO, R. F. V., SOUZA, B. B., OLIVEIRA, C. A.

RNA de Interferência: Novo mecanismo de silenciamento Gênico, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

12. MEDRANO, R. F. V., DELPHINO, F. F., PIGOSO, A. A.

Avaliação in vitro da atividade antioxidante de componentes da dieta, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

1. MEDRANO, R. F. V., CATANI, J. P. P.

Ciclo e Morte Celular, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. MEDRANO, R. F. V., CATANI, J. P. P.

Manipulação Gênica-Aplicações de ensaios de gene reporter utilizando vetores lentivirais, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Organização de eventos

1. I Curso de Inverno Em Oncologia Molecular da FMUSP, 2011.

2. 4º Jornada em Oncologia da FMUSP, 2011.

3. Dia Mundial de Combate à Tuberculose, 2008.

4. 1º Semana Acadêmica da Biomedicina, 2008.

5. 3º Workshop em Biotecnologia, 2008.