Ruana Calado da Costa

**Células-tronco mensequimais como carreadoras de adenovírus no
microambiente tumoral**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Bryan Eric Strauss

São Paulo

2017

Ruana Calado da Costa

**Células-tronco mensequimais como carreadoras de adenovírus no
microambiente tumoral**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Bryan Eric Strauss

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Ruana Calado da

Células-tronco mensequimais como carreadoras de adenovírus no microambiente tumoral / Ruana Calado da Costa. -- São Paulo, 2017.

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

Orientador: Bryan Eric Strauss.

Descritores: 1.Terapia gênica 2.Terapia combinada 3.Melanoma 4.Adenovírus
5.Interferon tipo I 6.Células tronco 7.Proteína supressora tumoral p53

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Álvaro da Costa (in memoriam) e Ivonise Calado, a minha irmã, Raissa Calado, e meu esposo Aldenio Borges.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Álvaro e Ivonise, por acreditar, apoiar, cuidar e investir em mim.

À minha irmã, Raissa, pelo apoio e preocupação.

Ao meu esposo, Aldenio, por estar presente em todas as circunstâncias e me ajudando no que for preciso.

Ao Professor Bryan Strauss pela confiança, paciência e orientação.

Ao Rodrigo Tamura pelo apoio, ajuda, ensinamentos e incentivo em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório Daniela Zanatta, Aline Hunger, Igor Luna, Ruan Medrano, Marlous Lana, Samir Andrade e mais uma vez ao Rodrigo Tamura, pela paciência e auxílio.

À Professora Mariz Vainzof e a sua aluna Marina Garcia por me ajudarem a trabalhar com as células-tronco mesenquimais.

Ao ICESP, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, pela excelente estrutura de trabalho.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer.....	1
1.2	O Melanoma.....	1
1.3	Terapia gênica	2
1.4	Adenovírus.....	3
1.5	Vetores Adenovirais.....	5
1.6	O p53.....	7
1.6.1	O p53 e o ciclo celular.....	7
1.6.2	O p53 e a apoptose.....	8
1.6.3	A via p53-MDM2-ARF.....	9
1.6.4	O status do p53 no melanoma.....	9
1.7	O ARF.....	10
1.8	O IFN.....	11
1.9	Células-tronco mesenquimais	12
2	JUSTIFICATIVA	15
3	OBJETIVO.....	16
3.1	Objetivo Geral.....	16
3.2	Objetivo Específicos.....	16
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1	Cultura Celular.....	17
4.2	Manuseio de Animais	17
4.3	Isolação das CTMs.....	18
4.3.1	CTMs provenientes da medula óssea (CTM-MO).....	18
4.3.2	CTMs provenientes do tecido adiposo (CTM-TA).....	18
4.4	Caracterização das CTMs.....	19
4.5	Diferenciação das CTMs em adipócitos, condrócitos e osteócitos.....	20
4.6	Ensaio funcionais com os vetores virais.....	21

4.6.1	Ensaios de eficiência de transdução com adenovírus.....	21
4.6.2	Avaliação morfológica das CTMs tratadas com os vetores Ad.RGD.PG.eGFP, Ad.RGD.PG.IFN β , Ad.RGD.PG.P19 ^{Arf} e a combinação Ad.RGD.PG.IFN β + Ad.RGD.PG.p19 ^{Arf}	22
4.6.3	Elisa para IFN β murino.....	22
4.6.4	Ensaio de MTT das CTMs tratadas com os vetores Ad.RGD.PG.eGFP, Ad.RGD.PG.IFN β , Ad.RGD.PG.P19 ^{Arf} e a combinação Ad.RGD.PG.IFN β + Ad.RGD.PG.p19 ^{Arf}	22
4.6.5	Co-cultura das CTMs transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ e/ou Ad.RGD.PG.IFN β com B16-GFP.....	23
4.6.6	Co-cultura das CTMs transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ e/ou Ad.RGD.PG.IFN β em conjunto com células B16 transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ ou Ad.RGD.PG.p19 ^{Arf}	24
4.7	Ensaios <i>in vivo</i>	24
4.7.1	Infiltração da CTM no tecido tumoral.....	24
4.8	Análise Estatística.....	25
5	RESULTADOS.....	26
5.1	Caracterização das CTMs provenientes da medula óssea (CTM-MO).....	26
5.2	Caracterização das CTMs provenientes do tecido adiposo (CTM-TA).....	27
5.3	Diferenciação das CTMs.....	28
5.4	Eficiência de transdução com adenovírus.....	30
5.5	Avaliação morfológica das CTMs tratadas com os vetores Ad.RGD.PG.eGFP, Ad.RGD.PG.IFN β , Ad.RGD.PG.P19 ^{Arf} e a combinação Ad.RGD.PG.IFN β + Ad.RGD.PG.p19 ^{Arf}	31
5.6	Elisa para IFN β murino.....	33
5.7	Ensaio de MTT das CTMs frente aos vetores Ad.RGD.PG.eGFP, Ad.RGD.PG.IFN β e a combinação Ad.RGD.PG.IFN β + Ad.RGD.PG.p19 ^{Arf}	34
5.8	Co-cultura das CTMs transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ e/ou Ad.RGD.PG.IFN β com B16-GFP.....	35
5.9	Co-cultura das CTMs transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ (controle negativo) e/ou Ad.RGD.PG.IFN β e/ou Ad.RGD.PG.p19 ^{Arf} com B16-GFP.....	37

5.10	<i>Homing</i> de CTMs ao sítio tumoral.....	39
6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÃO E PERSPECTIVA.....	46
8	REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura adenoviral.....	4
Figura 2: Genoma adenoviral.....	5
Figura 3: Caracterização das células mesenquimais extraídas da medula óssea (CTM-MO).....	26
Figura 4: Caracterização das células mesenquimais extraídas do tecido adiposo (CTM-TA).....	28
Figura 5: Diferenciação das CTMs.....	29
Figura 6: Transdução das CTMs com Ad.RGD.PG.eGPF em diferentes MOIs.....	30
Figura 7: Observação morfológica 24 horas após transdução das CTMs com os vetores adenovirais.....	31
Figura 8: Observação morfológica 48 horas após transdução das CTMs com os vetores adenovirais.....	32
Figura 9: Observação morfológica 72 horas após transdução das CTMs com os vetores adenovirais.....	33
Figura 10: Ensaio de Elisa para IFN β murino.....	34
Figura 11: Ensaio de MTT para medir resposta de CTM após transdução.....	35
Figura 12: Co-cultura CTM transduzida com Ad.RGD.PG.IFN β mais B16-GFP.....	36
Figura 13: Quantificação de B16-GFP a partir do ensaio de co-cultura.....	38
Figura 14: Corte transversal do tumor B16-F10 após injeção sistêmica de CTMs.....	39

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Tabela com alguns marcadores e suas funções utilizados na caracterização de células mesenquimais murinas.....	19
Tabela 2: Transdução de CTMs com Ad.RGD.CMV.LacZ (controle negativo) e/ou AD.RGD.PG.IFN β em preparação para co-cultura com B16-GFP.....	23
Tabela 3: Transdução de CTMs ou B16-GFP com os vetores indicados em preparação de ensaio de co-cultura.....	24

RESUMO

Costa RC. Células-tronco mensequimais como carreadoras de adenovírus no microambiente tumoral [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

As diferentes formas de câncer apresentam uma grande dimensão no âmbito da saúde pública mundial. Embora os esforços da medicina diagnóstica, vários tumores permanecem sem resposta adequada à terapia tradicional. Uma alternativa é o uso de terapia gênica, a qual consiste na transferência de um gene terapêutico para a célula tumoral, com a expectativa de inibir a progressão do tumor. Nosso laboratório desenvolveu uma série de vetores adenovirais onde a expressão do transgene é controlada por p53 e utilizamos estes vetores para mostrar que a presença de p19^{Arf} (parceiro funcional de p53) sensibiliza células de melanoma murino, B16-F10 (p53-selvagem), associado à ação de interferon-beta (IFN β , citocina pleiotrópica) quando testado *in vitro*. Mesmo que os vetores adenovirais representem o sistema de transferência gênica mais utilizado para terapia gênica do câncer, seu uso por via sistêmica é limitado principalmente por inativação pelo sistema imune. Diferentes técnicas visam proteger as partículas virais do sistema imune e as direcionar para o sítio tumoral. Uma dessas técnicas é através da utilização de células-tronco mesenquimais (CTMs). As propriedades da CTM incluem a auto-renovação, potencial de se diferenciar, além de sua capacidade de migrar aos tumores. Neste sentido, nosso objetivo foi de utilizar as CTMs murinas como carreadoras de adenovírus que expressam IFN β e verificar, se a presença de p19^{Arf} nas células tumorais aumenta sua sensibilidade para IFN β . Para isto, as CTMs foram isoladas de medula óssea ou tecido adiposo de camundongos C57BL/6 machos. Foi verificada a presença de marcadores de CTM (SCA1, CD29) e a ausência de marcadores de linhagens hematopoiéticas (CD31, CD11b, CD45). Sendo as CTM de tecido adiposo mais fáceis de cultivar, estas foram utilizadas nos ensaios posteriores. *In vitro*, aplicação de vetor adenoviral portador de gene repórter (eGFP) resultou em mais de 70% de eficiência de transdução das CTM, sem indução de alteração morfológica mesmo 72 horas após tratamento. A aplicação de vetor portador de IFN β também foi bem tolerada, porém a transdução com p19^{Arf} sozinho ou em combinação com IFN β induziu alteração morfológica nas CTMs.

Ensaio de co-cultura com células B16-F10 transduzidas ou não com o vetor portador de p19^{Arf} e CTMs transduzidas ou não com IFN β , na proporção 1:9 (1 CTM para 9 B16-F10), demonstraram que a presença de p19^{Arf} confere aproximadamente 3 vezes mais sensibilidade nas células B16-F10 ao tratamento com IFN β , comparado com o tratamento só com o IFN β no período de 72 horas de co-cultura. *In vivo* foi possível detectar em tumores subcutâneos derivados de B16-F10, a presença de células mesenquimais expressando eGFP 48 horas após injeção das CTMs, indicando que as CTMs infiltraram o microambiente tumoral.

Descritores: terapia gênica, terapia combinada, melanoma, adenovírus, células-tronco, interferon tipo I, proteína supressora de tumor p53.

ABSTRACT

Costa RC. Mesenchymal stem cell as carrier of adenovirus in the tumor microenvironment [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

The many different forms of cancer represent a tremendous investment for public health all over the world. Although the efforts of both diagnostic and therapeutic medicine have reduced the number of deaths due to cancer, many tumor types remain impervious to traditional therapy. An alternative is the use of gene therapy which entails the transfer of a therapeutic gene to the tumor cells with the expectation of inhibiting tumor progression. Our laboratory has developed a series of adenoviral vectors where transgene expression is controlled by p53 and we have used these vectors to show that the presence of p19^{Arf} (a functional partner of p53) sensitizes murine melanoma cells, B16-F10 (p53-wild type), to the action of interferon-beta (IFN β , a pleiotropic cytokine) when tested *in vitro*. Even though adenoviral vectors are the most utilized gene transfer system for cancer gene therapy, their systemic application is limited principally by immune inactivation. Different techniques aim to protect the virus particles from the immune system and to direct them to the tumor bed. One of these techniques involves the utilization of mesenchymal stem cells (MSCs). The properties of MSCs include self-renewal, the potential for differentiation as well as their ability to migrate to and infiltrate tumors. To this end, our objective was to utilize murine MSCs as carriers of adenovirus that express IFN β and to verify if the presence of p19^{Arf} in the tumor cells would enhance their sensitivity to IFN β . For this, MSCs were isolated from bone marrow or adipose tissue from male C57BL/6 mice. The presence of MSC markers (Sca1, CD29) was verified as was the absence of markers for hematopoietic lineages (CD31, CD11b, CD45). Since the MSCs from adipose tissue were easier to cultivate, these were utilized in the following assays. *In vitro*, application of the adenoviral vector encoding a reporter gene (eGFP) at a multiplicity of infection of 1000 resulted in the transduction of more than 70% of the MSCs and without the induction of morphological alterations even by 72 hours post treatment. The application of a vector encoding IFN β was also well tolerated, however transduction with p19^{Arf} alone or in combination with IFN β induced morphologic alterations in the MSCs. Next, B16-F10 cells were transduced or not with the vector encoding p19^{Arf} and co-cultivated with MSCs that had

been transduced or not with IFN β , demonstrating that the presence of p19^{Arf} confers enhanced sensitivity of B16-F10 cells to the treatment with IFN β . In preliminary assays, B16-F10 tumors were established subcutaneously in C57BL/6 mice and later MSCs labeled with eGFP were applied in the circulation upon tail vein injection. After 48 hours, these tumors were recovered and the presence of eGFP-positive cells was confirmed, indicating that the MSCs infiltrated the tumor microenvironment.

Descriptos: genetic therapy, combined modality therapy, melanoma, adenovirus, stem cells, interferon type I, tumor suppressor protein p53.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

É um evidente problema de saúde pública mundial, caracterizado pela descontrolada proliferação celular, levando uma célula normal à neoplásica, existem mais de 100 tipos e subtipos de câncer. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que no ano 2030 espera-se 21,4 milhões de casos incidentes de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer (1).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2016 e 2017 aponta a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Entre os homens, são esperados 295.200 casos, e entre as mulheres, 300.800. O câncer de pele do tipo não melanoma (aprox. 180 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (aprox. 61mil) nos homens, mama feminina (aprox. 58 mil), cólon e reto (aprox. 34 mil), pulmão (aprox. 28 mil), estômago (aprox. 20 mil) e colo do útero (aprox. 16 mil). Em homens os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e nas mulheres os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (1).

1.2. O MELANOMA

Espera-se para esse biênio 2016/2017, no Brasil, um total de aprox. 182 mil novos casos de câncer de pele, contando os casos de pele não-melanoma e pele melanoma. O melanoma é o mais agressivo tipo de câncer de pele, porém a sua incidência é baixa (aprox. 6 mil novos casos para 2016/2017) (1).

O melanoma ocorre nas células produtoras de melanina, os melanócitos, apresentando uma alta possibilidade de metástase, por isso é mais grave que os casos de câncer de pele não-melanoma. A exposição à radiação ultravioleta (UV) está relacionada ao início e à progressão de diversos tipos de melanoma. Um paciente com melanoma, em estágios avançados, tem em média uma sobrevida de 6 a 9 meses. Várias alterações genéticas podem ser observadas nesse tipo de neoplasia como: deleção de p16^{INK4a} e do receptor de melanocortina 1 (MC1R), mutações de RAS e BRAF (2, 3).

1.3. TERAPIA GÊNICA

A terapia gênica (TG) é uma forma de tratamento experimental capaz de superar a causa genética de uma doença e tem como objetivo reparar a perda ou o mau funcionamento de um gene celular, transferindo genes terapêuticos para células do paciente através da engenharia genética (4).

A TG foi criada, inicialmente para o tratamento de doenças monogênicas, assim teria como objetivo substituir e/ou complementar gene deficiente por cópia selvagem do gene causador da doença (como por exemplo, fator IX para hemofilia B). Porém, atualmente, a maioria dos protocolos de terapia gênica é destinada para o tratamento do câncer, que embora não seja uma doença monogenética, apresenta geralmente mutações em proto-oncogenes ou genes supressores de tumor. De acordo com Hanahan e Weinberg (2011), existem 10 características distintas que a célula tumoral adquire e assim possibilita o crescimento tumoral e uma disseminação sistêmica, características essas que são: autossuficiência de sinais de crescimento, desenvolvimento de mecanismos de escape dos genes supressores tumorais, evasão do sistema imune, indução de angiogênese, instabilidade e mutação do genoma, insensibilidade a sinais anti-proliferativos, potencial de replicação ilimitado, capacidade de invasão tecidual e metástase, resistência à morte celular e desregulação do metabolismo energético. Essas características citadas acima são o ponto de partida para vários estudos e o objetivo da terapia gênica do câncer é interromper alguns desses mecanismos que levam ao desenvolvimento tumoral (4, 5).

De acordo com o *The Journal of Gene Medicine*, até o ano de 2016 foram realizados 2409 protocolos clínicos envolvendo transferência gênica, distribuídos da seguinte maneira: câncer (64,5%), doenças monogênicas (10,3%), doenças infecciosas (7,5%), doenças cardiológicas (7,4%), e outras como doenças neurológicas, oculares e inflamatórias (6).

A introdução de genes terapêuticos em células é realizada através de um “vetor” que é um veículo com capacidade de internalização pelas células vivas. Entre os principais vetores encontram-se: os plasmídeos, os vetores virais e os vetores nanoestruturados. Entre a classe dos vetores virais, os mais utilizados em protocolos clínicos em terapia gênica são: adenovírus (21,4%), retrovírus (18,2%), plasmídeos (17,2%), vírus adeno-associado (7,0%), lentivírus (5,8%) e o vírus herpes simplex (3,6%) (4, 6).

De acordo com o *The Journal of Gene Medicine* (2016), como foi visto acima, 64,5% dos protocolos clínicos utilizando a terapia gênica foram destinados ao tratamento do câncer, do total de 1554 protocolos, 388 foram realizados utilizando o adenovírus com o objetivo de inibir a proliferação e desencadear morte das células tumorais (6).

1.4. ADENOVÍRUS

Adenovírus (Ad) é um dos vetores mais comumente usados para a terapia gênica. Com o avanço das pesquisas, já foram aprovados dois produtos utilizando adenovírus para o tratamento de câncer na China, que são o Gendicine (adenovírus que expressa o p53 selvagem, utilizado em pacientes com tumores de células escamosas de cabeça e pescoço) e Oncorine (adenovírus oncolítico com replicação condicional, utilizado no tratamento de carcinoma de nasofaringe) (7).

Os adenovírus foram descobertos pela primeira vez em 1953, por Rowe et al. (1953). Pertence à família *Adenoviridae*, tem um tamanho de 70-90 nm de diâmetro. Até agora, 60 diferentes sorotipos de adenovírus humanos foram identificados, e estão divididos em sete subgrupos (A-G) com base na sua capacidade de neutralizar e aglutinar eritrócitos humanos, macacos, ratos e oncogenicidade em roedores. (8-10).

A estrutura externa do adenovírus é composta por 3 proteínas estruturais básicas: o hexon, a base pentônica e a fibra, de acordo com a figura 1. O hexon é a proteína mais abundante que dará toda a estrutura e estabilidade da partícula viral, que é em forma de um icosaedro; a base pentônica vai dar suporte a fibra, além de conter 2 domínios, o domínio RGD, que interage com proteínas da membrana celular do hospedeiro chamadas integrinas $\alpha_v\beta$, sinalizando para a internalização da partícula viral, e o segundo domínio da base pentônica, que é responsável pela variação dos sorotipos virais; a fibra apresenta variabilidade em tamanho e flexibilidade dentre os diferentes sorotipos adenovirais, é composta por 3 partes: *tail*, *shaft* e *knob*, que é responsável pela primeira interação viral com a célula. Através da região *knob* ocorrerá a interação com o receptor CAR (*coxsackie adenovirus receptor*) na membrana celular, que é o principal receptor para a maioria dos adenovírus, nas espécies A, C, D, E e F (11, 12).

Figura 1: Estrutura adenoviral. Com suas principais proteínas estruturais: hexon, base pentônica e a fibra. Fonte: Figura cedida pelo Samir Andrade, membro do nosso grupo, e adaptada.

O genoma do adenovírus é composto por DNA linear de fita dupla, com tamanho de aproximadamente 30 a 40 kb, o qual é flanqueado nas extremidades 3' e 5' por ITRs (*inverted terminal repeats*), que são a origem de replicação. Próximo a ITR da extremidade 3' está o sinal de empacotamento, que tem como função a internalização do genoma no capsídeo. O genoma adenoviral também é composto pelos genes E (*early genes*), chamados assim por serem expressos na fase precoce da replicação do DNA; e os genes L (*late genes*), que são expressos na fase tardia da replicação, como mostra a figura 2 (13, 14).

Os genes E codificam proteínas que regulam a replicação viral, e são classificados de 1 a 4 (Figura 2). O gene E1 é composto por 2 subunidades, o E1A e E1B. O E1A é o primeiro gene viral expresso quando o genoma viral atinge o núcleo. Ao iniciar a fase de replicação viral, o gene E1A se liga ao RB (o qual é responsável pela transição das células de G1 para a fase S do ciclo celular) induzindo a célula a entrar na fase S. Ao formar o complexo E1A+RB o complexo RB+E2F se desfaz, deixando o E2F livre, o que vai estimular a transcrição do gene E2A e dos demais genes precoces. O gene E1B tem dois produtos diferentes: a E1B19K (proteína 19K), que é um análogo de Bcl-2 (anti-apoptótico), e a E1B55K (proteína 55K), que vai se ligar a região amino-terminal da proteína p53, inativando-a. Ou seja, o gene E1 tem como

principal função prolongar a sobrevivência da célula que está sendo usada para produção da partícula viral e inibir que a mesma entre em apoptose, também tem papel na replicação viral e transporte de RNA viral. (13, 15-17)

O gene E2A/B codifica proteínas necessárias para a replicação do genoma adenoviral. O gene E3 impede o desencadeamento da ação do sistema imunológico da célula hospedeira contra o adenovírus. E o gene E4 tem uma variedade de funções na replicação e transcrição do DNA viral, regulação da produção proteica; transporte do mRNA; e inibição da apoptose (13, 15-18).

Os genes L (L1-L5) codificam as proteínas estruturais para a montagem dos vírus, incluindo as proteínas do hexon, fibra e base do penton, entre outras (Figura 2). (13, 19).

Figura 2: Genoma adenoviral. Compostos pelos *early genes*, E, e os *late genes*, L, flanqueados em suas extremidades 3' e 5' por ITRs (*inverted terminal repeats*). Fonte: figura cedido pelo Samir Andrade, membro do grupo.

1.5. VETORES ADENOVIRAIS

Existem 3 tipos de vetores adenovirais. Os de primeira geração contêm deleções na região E1 e E3. Os vetores de segunda geração são caracterizados por terem deleções na região E2 ou E4 além da E1 e E3. Os de terceira geração são chamados vírus *gutless*, *helper-dependent* ou de alta capacidade, que são desprovidos de todos os genes virais, exceto repetições terminais invertidas (ITRs) e sequências de empacotamento, e necessitam de vetores *helper*, que expressam as proteínas estruturais. Há também o adenovírus oncolítico que podem se replicar seletivamente em tumores, causando a lise celular e a morte, devido à deleção de genes virais necessários para replicação em células normais, mas não tumorais (12).

O mais utilizado é o adenovírus de primeira geração, da espécie C, derivado do sorotipo 5, conhecido como adenovírus 5 (Ad5) que, como descrito acima, possui deleções da região E1A e de parte da E1B, regiões responsáveis pela regulação da

expressão das proteínas virais. A deleção dessas regiões torna o vetor seguro, pois não terá capacidade de se replicar em qualquer célula; e também deleções na região E3. Assim, a produção viral é feita em células que expressam a proteína E1. Graham et al (1977), transfectou células *human embryonic kidney* para expressar a proteína E1, tal célula ficou conhecida como HEK-293. Nestas células é possível que o vetor adenoviral possa se replicar e assim podemos obter altos títulos das partículas virais (13, 14, 20).

Vários são os motivos para utilizar os vetores adenovirais na TG: (11-14)

- i. Quando produzidos em GMP podem gerar títulos elevados de até 1×10^{13} partículas por mL;
- ii. Possuem grande capacidade de inserções de até 7,5 kb nos adenovírus de primeira geração e de até 36 kb para os vetores *helper-dependent*;
- iii. Não ocorre integração do genoma viral com o da célula hospedeira, nem rearranjo do transgenes, é estável, além da expressão do transgenes ser transitória;
- iv. Possuem uma boa transdução em células mitóticas e pós-mitóticas;
- v. Podem infectar uma grande variedade de tecidos.

Porém também existe limitação quanto ao uso do vetor adenoviral:

- i. Imunogenicidade das proteínas virais, as células humanas produzem anticorpos neutralizantes e respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL) contra as proteínas do hexon, da base pentônica e da fibra do capsídeo viral quando administrado *in vivo* (14);
- ii. Dependência pelo receptor CAR, o CAR é expresso em diversos tecidos, como os do pâncreas, cérebro, coração, intestino delgado, testículos, o que leva a uma boa transdução com os vetores adenovirais, caso a célula alvo seja ausente de receptores CAR, encontrará uma baixa eficiência de transdução. Essa limitação pode ser resolvida através de modificações na proteína da fibra. Mizuguchi *et al.* (2001) modificou a proteína fibra (entre resíduos 546 e 547) do adenovírus Ad5 com a inserção do tripeptídeo RGD (arginina, glicina e ácido aspártico) sendo capaz de transduzir células que expressam integrinas $\alpha_v\beta$, como células de glioma humano (21);
- iii. Sequestro da partícula viral para o fígado, a maior parte das partículas de vetores

adenovirais, Ad5, injetados via sistêmica são sequestrados para o fígado, os hepatócitos são facilmente transduzidos e/ou o vírus é fagocitado pelos macrófagos residentes no fígado, células de Kupffer (KCs), causando toxicidade, resposta inflamatória, e assim reduzindo a dose eficaz de vírus (14, 21, 22).

1.6. O p53

A proteína p53, transcrita pelo gene *TP53*, é um importante supressor tumoral e sua função é manter a integridade genômica induzindo as células a entrar em parada do ciclo celular ou desencadear apoptose, senescência, autofagia em respostas a vários tipos de estresse. O processo de ativação/inativação da p53 manifesta-se por várias modificações pós-traducionais que incluem fosforilação, ubiquitinação, acetilação, metilação, glicosilação, entre outras, que afetam a sua estabilidade e atividade (23, 24).

O papel transcricional da proteína p53 foi identificado pela primeira vez em leveduras, onde demonstraram que a porção N-terminal (aminoácidos 1-45) de p53 corresponde a um domínio de transativação. Subsequentemente, foi demonstrado que o meio da proteína p53 (aminoácidos 110-290) corresponde à região de ligação ao DNA (é dentro desta região onde a maioria das mutações de p53 é observada). A região carboxi-terminal de p53 contém tanto a região de tetramerização (aminoácidos 310-363) como a região reguladora (25).

1.6.1. O P53 E O CICLO CELULAR

A progressão do ciclo celular é controlada pela formação sequencial de ativação e inativação de uma série de complexos de ciclina-CDK, enzimas do tipo quinase de serina/treonina, cuja subunidade catalítica é conhecida como CDK (*cyclin-dependent kinase*). Estes pontos de controle podem ser desregulados na oncogenese, devido a alterações nas atividades dos complexos ciclina-CDK. Em particular, a desregulação na fase G1 ou START, o ponto de restrição que precede a fase S, o que permitir o crescimento e a divisão das células rapidamente (25).

No ciclo celular, a ciclina tipo D ativa CDK4, formando um complexo, e em algumas células, CDK6, formando outro complexo, e assim dirige a célula a entrar na fase G1. O complexo Ciclina-D-CDK4 fosforilado, e a hipofosforilação do Rb (a proteína retinoblastoma) liberará o E2F (proteína de regulação gênica), do complexo Rb-E2F, permitindo assim que a célula entre na fase S do ciclo celular. A ciclina tipo E

mais o CDK2, na fase G1, formará outro complexo que levará a transição da fase G1 para S. Posteriormente na fase S atua a ciclina tipo A (25).

Para inibir a ação dos CDKs existe o CDKI, (inibidor de CDK). O primeiro CDKI descoberto, regulado pelo p53, foi o p21^{WAF1}. O p21 interage com todas as CDKs, porém com grau de afinidade diferente. Além da p21^{WAF1} existe a p16, p17, p27^{KIP1} (25).

Assim a p53 promove a parada do ciclo celular através da transativação do p21^{WAF1} atuando na fase G1 do ciclo celular e impedindo a entrada na fase S, além desse existem mais 2 genes alvos críticos: a GADD 45 (*Growth Arrest and DNA Damage*) e 14-3-3 σ , atuando na parada de transcrição da fase G2/M do ciclo celular (25, 26).

1.6.2. O P53 E A APOPTOSE

P53 ativa o gene p21^{WAF1}, o qual então inibe a atividade dos complexos ciclina-CDK resultando em uma parada em G1. A iniciação da apoptose pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular, porém preferencialmente na fase G1. Isto indica que genes de resposta a p53 diferentes de p21^{WAF1} estão envolvidos na via apoptótica. A p53 ativa e controla genes proapoptóticos membros da família Bcl-2, como o Bax, Noxa, Puma. A apoptose dependente de p53 depende da Apaf-1/caspase-9 e envolve a liberação mitocondrial do citocromo c (25, 27).

Entre os genes transativados por p53 que codificam proteínas localizadas na membrana plasmática são: Killer/DR5, CD95 (Fas/APO-1) e PERP, dois primeiros são membros da família de receptores de TNF, e o PERP é uma proteína da membrana plasmática. Todos esses são induzidos por danos ao DNA e estão relacionados à ativação da via apoptótica dependente de p53 (26).

Os genes transativados por p53 que codificam proteínas que agem na mitocôndria são:

- i. Bax: a proteína Bax proapoptótica é conhecida por se acumular nas mitocôndrias em resposta a sinais de morte. Bax partilha homologia com Bcl-2. A expressão de Bax não induz apoptose, mas reduz significativamente o tempo para completar a apoptose (26);
- ii. Noxa: é induzido por radiação ionizante, dependente de p53. Codifica uma proteína de 103 aminoácidos e contém a ligação com o BH3 que se encontra nos

membros da família Bcl-2. Noxa interage com membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) através do seu domínio BH3. (26).

- iii. PUMA, a proteína PUMA interage com Bcl-2 e Bcl-XL através do seu domínio BH3. A expressão de PUMA inibe o crescimento celular e induz rapidamente a apoptose através de uma via que envolve a libertação de citocromo c e a ativação da proteína caspase 3 e 9 (26).
- iv. p53^{AIP1}, proteína indutora de apoptose regulada por p53, a sua expressão resulta na supressão do crescimento e apoptose (26).

Entre os genes induzidos por p53 (PIDs) que a proteína irá agir no citoplasma são os Ei24/PIG8 e PIDD, que estão envolvidos na apoptose através da geração de espécies reativas de oxigénio (26).

1.6.3. A VIA P53-MDM2-ARF

A proteína p53 tem uma meia-vida curta e é mantida a níveis baixos em condições normais. A oncoproteína Mdm2 e a ARF-BP1/Mule (*ARF-binding protein 1/Mcl1-ubiquitin ligase E3*) são ubiquitininas E3 ligase, que tem como função degradar e bloquear a atividade de p53. Se a célula sofre algum tipo de estresse ou dano no DNA, a proteína ARF (a qual será descrita no próximo tópico), localizada no nucléolo, se liga ao Mdm2 e o desloca para o nucléolo, bloqueando-o e deixando p53 livre para desenvolver a sua função. A superexpressão ou amplificação de Mdm2 é observada em múltiplos tumores humanos, incluindo sarcomas, gliomas e leucemias, sendo que muitas destas apresentam p53 selvagem (24, 28, 29).

A via p53 também pode ser ativada pela ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) e ATR (*ATM and Rad 3-related*), proteínas que pertencem a família da PIKK (*phosphoinositide 3-kinase related kinases*), que desempenham papel na transmissão de sinal através de *checkpoints* do ciclo celular. Quando ocorre um dano no DNA, a via de p53 é ativada por proteínas quinases ATM e/ou ATR, que medeiam a rápida destruição de Mdm2 durante a resposta ao dano do DNA (30).

1.6.4. O STATUS DO P53 NO MELANOMA

As mutações no gene supressor tumoral p53 ocorrem em aproximadamente metade de todos os tumores humanos como, carcinoma de ovários, câncer no fígado,

leucemia, na maioria dos carcinomas de pele, já nos casos de melanoma somente 10% apresentam mutação em p53, o restante mantém o p53 na sua forma inativa (31, 32).

Takaoka *et al* (2003), verificou que o supressor tumoral p53 e o IFN- α/β são essenciais para a indução da apoptose em células tumorais e em respostas imunes antivirais. Apontou que a transcrição do gene p53 é induzida por IFN- α/β , acompanhada por um aumento no nível de proteína p53, que contribui para a supressão tumoral. Além disso, constatou que p53 é ativado em células infectadas por vírus, provocando uma resposta apoptótica e que p53 é crítico para a defesa antiviral do hospedeiro (33).

Como forma de tratamento do melanoma, já que este possui p53 selvagem, Strauss e Costanzi-Strauss (2005) desenvolveram um retrovírus com um promotor responsivo à p53, o promotor PG, para dirigir a expressão do transgene contido no vetor viral, tal promotor elevou os níveis de expressão do transgene até 7 vezes mais do que visto com o promotor parental (não modificado). Logo em seguida em 2008, Bajgelman e Strauss desenvolveram um adenovírus com um promotor responsivo à p53, o que aumentou os níveis de expressão do transgene até 5 vezes mais do que visto com o promotor parental (não modificado). O vetor adenoviral do sorotipo 5 e não replicativo, AdPG, contendo um promotor quimérico responsivo à p53, também foi modificado com a inserção dos cDNAs para p19^{Arf} e IFN β e com a inserção do tripeptídeo RGD (arginina, glicina e ácido aspártico) na região *knob* da fibra viral, criando assim os vetores Ad.RGD.PG.p19^{Arf} e Ad.RGD.PG.IFN β , respectivamente (34-36).

1.7. A ARF

O locus CDKN2a localizado no cromossomo 9p21, codifica dois membros da família INK4, inibidores de quinase dependentes de ciclina, o p15^{INK4b} e p16^{INK4a}, ambos regulam a progressão do ciclo celular através da fase G1 (37).

A ARF, p14^{ARF} em humanos - proteína com 132 aminoácidos - e p19^{Arf} em murinos - proteína com 169 aminoácidos, é originada através de janela de leitura alternativa, *alternate reading frame*, do INK4a, sendo que ARF não está relacionada com a proteína INK4a. O p16^{INK4a} e ARF não são isoformas e têm funções distintas nas células. Porém ambos são supressores tumorais, p16^{INK4a} atua diretamente sobre Rb, inibindo sua fosforilação, o que bloqueia a saída da fase G1, controlando a progressão tumoral. Já ARF por sua vez inibe a degradação do fator de transcrição p53, o que também desencadeia a parada do ciclo celular (37).

Aumento nos níveis de ARF, devido a uma sinalização oncogênica, estimula a atividade de p53, ao neutralizar os efeitos inibitórios de Mdm2 e ARF-BP1/Mule, deixando a p53 livre. Assim, ARF eleva os níveis de p53 e resulta em parada do ciclo celular ou apoptose (37, 38).

ARF ainda tem outras funções: (1) funciona independentemente de p53 para inibir o crescimento celular, interagindo diretamente com Myc e E2F1, atenuando a atividade de transativação desses genes promotores de crescimento; (2) ARF é um regulador na sinalização de ATM e/ou ATR por mecanismos que não envolvem as vias p53, mas modificam a atividade das enzimas ATM/ATR direta ou indiretamente durante um dano no DNA; (3) além disso, há também algumas evidências de que a ARF contribui para algumas vias de reparo do DNA e para a estabilidade cromossômica independentemente da p53 (29, 30, 39, 40).

1.8. O IFN

Os interferons (IFNs) são citocinas pleiotrópicas compostas por três tipos: IFN tipo I humano são agrupados no cromossoma 9p e codificam uma família de 17 proteínas distintas (incluindo 13 subtipos de IFN α , mais IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN τ e IFN ω). Estas ligam-se a um receptor transmembranar heterodimérico, denominado receptor IFN α (IFNAR), que é composto por subunidades IFNAR1 e IFNAR2; IFN de tipo II, existe apenas um único tipo, que é o IFN γ ; os IFNs de tipo III consistem em IFN λ 1, IFN λ 2 e IFN λ 3 (também conhecidos como interleucina 29 (IL29), IL28A e IL28B, respectivamente) e IFN λ 4. A expressão de IFN de tipo I e de tipo III é ativada através de receptor de reconhecimento de padrões (PRR) e por citocinas; já o IFN de tipo II é induzido principalmente por citocinas tais como IL12 e IL18, que são expressas por células imunes, particularmente por células T e *natural killer* (NK) (41, 42).

O IFN de tipo I pode regular a atividade de quase todos os tipos de células imunes (incluindo macrófagos, células dendríticas (CDs), células B, células T e linfócitos). Detendo-se ao interferon β , ele efetua algumas funções principais: (41, 42)

- i. São imunomoduladores, eles modulam as respostas imunes inatas promovendo a apresentação do antígeno, os macrófagos são os primeiros a produzir IFNs;
- ii. Induzem citotoxicidade, limitando a propagação de agentes infecciosos, levando as células imunes vizinhas a secretarem citocinas pró-inflamatórias importantes para células imune-efetoras;

- iii. Inibem a angiogênese;
- iv. Ativam o sistema imune adaptativo, promovendo assim o desenvolvimento de respostas de células T e B específicas e células de memória imunológica.

No contexto tumoral, os IFN de tipo I podem: (42)

- i. Aumentar a expressão de antígenos tumorais;
- ii. Ativar CDs para apresentarem o antígeno tumoral às células T, célula T CD8+ efectoras;
- iii. Regulam negativamente a proliferação de células T reguladoras (Treg), que são células T CD4+ que restringem a atividade das células T efectoras;
- iv. Suprimir a atividade das células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC) que se acumulam na circulação dos pacientes tumorais, estas têm função pró-tumoral, suprimem a atividade dos linfócitos T citotóxicos;
- v. IFN γ induz a polarização de macrófagos imunoestimuladores (M1) para macrófagos imunossupressores (M2);
- vi. Apresentação de antígenos por complexos de histocompatibilidade (MHCs);
- vii. Estimulação de quimiocinas, citocinas e interleucinas, por exemplo a IL-15 que desempenha um papel dominante na expansão e manutenção da população de linfócitos após a exposição a IFN.

1.9. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

O patologista Cohnheim (1867) observou pela primeira vez a presença de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea, com morfologia semelhante a fibroblastos, que migravam para os locais de lesão e hipotetizou que estas auxiliavam na regeneração do tecido danificado. Aproximadamente 100 anos após Cohnheim, Friedenstein *et al* (1968) descreveu pela primeira vez, a célula-tronco mesenquimal (CTM), ainda não conhecida por esse nome, uma pequena subpopulação de fibroblastos formadores de colônias que poderiam ser distinguidos do restante das células da medula óssea com base na sua aderência plástica, aparência em forma de fuso e expansão rápida, durante o estudo sobre o isolamento, cultura e diferenciação osteogênica de células derivadas da medula óssea. Owen (1988) e Caplan (1991) introduziram os termos células-tronco estromal e células-tronco mesenquimais (CTMs) (43-46).

As CTMs são células-tronco multipotentes, adultas, indiferenciadas, não hematopoiéticas, podem ser isoladas a partir de muitas fontes, incluindo da medula óssea (MO), do tecido adiposo (TA), do sangue periférico, do sangue do cordão umbilical, polpa dentária, ossos, músculos e cartilagens; podendo ser expandida com relativa facilidade em garrafas e placas de cultura, são semelhantes a fibroblastos, possuem propriedades auto-renováveis, com a capacidade de produzir células progenitoras mais diferenciadas. Na presença de fatores específicos de indução, CTMs diferenciam-se em células mesodérmicas como adipócitos, condrócitos e osteoblastos (47).

Os fenótipos das CTMs isoladas da medula óssea de humanos e camundongos são muito semelhantes e como não existe um marcador específico, as CTMs são normalmente definidas por um painel de marcadores de superfície celular que incluem SCA-1 (*stem cell antigen 1*), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), CD105 endoglina: marcador angiogênico), bem como as moléculas de adesão CD44 (receptor de hialuronato), CD29 (integrinas V α 1 β), CD54 (ICAM1), CD106 (VCAM-1- molécula de adesão vascular) e CD166 (ALCAM - moléculas de adesão de leucócitos ativados). As CTMs não expressam marcadores hematopoiéticos tais como CD34 (receptor de células endoteliais), CD45 (antígeno comum de leucócito), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS) e CD11b (marcador de célula imune - integrina Mac-1), CD19 (marcador para linfócito), CD79 ou moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40 (48).

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular, as CTMs são células indiferenciadas definidas pela sua capacidade de: (49)

- i. Aderir a superfícies plásticas durante o cultivo;
- ii. Expressar os marcadores CD73, CD90, CD105 em 95% da população celular, e serem negativos na presença do CD11b ou CD14, CD19 ou CD79 α , CD45, maior que 95% da população celular;
- iii. Capacidade de se diferenciar em osteócitos, condrócitos e adipócitos *in vitro* quando cultivadas em meios indutores específicos.

As CTMs, além de terem capacidade de se diferenciar em osteócitos, condrócitos e adipócitos, podem se diferenciar em outras linhagens mesodérmicas, como miócitos esqueléticos, cardiomiócitos e células endoteliais. Além disso, em condições apropriadas, as CTMs têm a capacidade de se diferenciar em tipos de células

de linhagens endodérmicas e ectodérmicas, incluindo hepatócitos, células neuronais com funções neuronais, células do ducto epidérmico e sebáceo. Paralelamente ao seu papel principal como reservas de células indiferenciadas, as CTMs têm funções imunomoduladoras que são exercidas por contatos diretos célula a célula, secreção de citocinas e/ou por uma combinação de ambos os mecanismos, dando-as capacidade de migrar e enxertar em locais de inflamação, lesão e áreas tumorais (47, 50-52).

No contexto tumoral, na formação de um tumor sólido, os sítios de angiogênese estão aumentados, caracterizados por perfusão vascular deficiente e hipóxia. Condições de baixo oxigênio ativam os fatores induzidos por hipóxia (HIF, *hypoxia induced factors*) que, por sua vez, podem aumentar ainda mais a produção de citocinas inflamatórias e pró-angiogênicas envolvidos no recrutamento de CTMs (53).

Hong *et al* (2014), em sua revisão, descreve que as CTMs, quando migram ao tumor podem agir de duas formas: a primeira é no desenvolvimento tumoral através da supressão da resposta imune (secretando IDO, NO, PGE2, IL-6), promoção de metástase, promoção de angiogênese, secretando fatores angiogênicos como: VEGF, PDGE, BFGF, IL-6, IL-8, TGF- β , FGF-7 e mediação na transição epitélio-mesênquima (EMT). A segunda forma de ação da CTM frente ao tumor é com o intuito de inibir a proliferação tumoral, através da inibição da via de sinalização de Wnt/ β -catenina (desempenha papel significativo na proliferação celular, migração e diferenciação de células-tronco e células tumorais) e da inibição da via de sinalização de Akt (que estimula a progressão, sobrevivência, migração e metabolismo do ciclo celular através da fosforilação de resíduos de serina ou treonina). Portanto, CTMs podem ser aliadas ou adversárias das células tumorais. Podem afetar no desenvolvimento do tumor dependendo da sua origem ou população, do número de células administrado, do grau de diferenciação e do tipo de células tumorais com as quais interagem (54).

Uma estratégia de combate às células tumorais é a utilização das CTMs como veículo, graças ao seu potencial de migração, para entrega de agentes terapêuticos, como IFN- β , TRAIL, IL-12 (54).

2. JUSTIFICATIVA

Esse projeto foi elaborado pela junção de vários fatores:

- i. Como já citado anteriormente, as CTMs têm a capacidade de migrar até os tecidos tumorais, por possuírem regiões de hipóxia, mediadores quimiotáticos como citocinas e quimiocinas, entre outros;
- ii. Interessantemente, estas regiões de hipóxia em tumores são sítios com células resistentes à quimioterapia e à radioterapia;
- iii. Os vetores adenovirais (Ad5) administrados por via sistêmica, podem acarretar em imunogenicidade das proteínas virais, assim como as partículas virais podem ser sequestradas para o fígado. Assim surgiu o interesse de utilizar as CTMs, na terapia gênica do câncer, como veículo, carregadas de um vetor adenoviral, a qual levará e protegerá o adenovírus até o foco tumoral.

O vetor a ser utilizado como tratamento já é bem explorado pelo grupo, que são o Ad.RGD.PG.IFN β e o Ad.RGD.PG.p19^{ARF}. No trabalho de Merkel *et al*, 2013, a transferência *in situ* de um gene supressor de tumor (p19Arf) associado com um gene imuno modulador (IFN β) tornou as células de melanoma murino mais susceptíveis à morte celular comparado com o tratamento isolado do Ad.PG.IFN β e o Ad.PG.p19^{ARF} em ambos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Verificando também que, pelo teste de TUNEL, o IFN β tem o papel de controlar o crescimento tumoral e o p19^{ARF} exerce a morte das células tumorais (29, 36, 55).

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Incorporar a tecnologia das células mesenquimais como carreadoras de vetor adenoviral e uso desta estratégia para verificar se células de melanoma murino expressando p19^{Arf} seriam sensibilizadas a atividade de IFN β *in vitro* e *in vivo*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Isolar e cultivar as CTMs derivadas da medula óssea e do tecido adiposo. Confirmar a identidade dessas células através de detecção da presença de marcadores das CTMs e ausência de marcadores hematopoiéticos. Além de avaliar a sua capacidade para diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos.
- B) Avaliar a resposta das CTMs à transdução com os vetores adenovirais Ad.RGD.PG.eGFP, Ad.RGD.PG.IFN β , Ad.RGD.PG.p19^{Arf} e a combinação Ad.RGD.PG.IFN β , Ad.RGD.PG.p19^{Arf} em diferentes multiplicidades de infecção.
- C) Determinar a influência do p19^{Arf} na resposta de células de melanoma murino quando expostas as CTMs expressando IFN β *in vitro*
- D) Testar a resposta de tumores subcutâneos expressando p19^{Arf} em camundongo C57BL/6 ao tratamento sistêmico com CTMs transduzidas com Ad.RGD.PG.IFN β

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTURA CELULAR

Foram utilizadas duas linhagens celulares. B16-F10 (melanoma murino, p53-selvagem) foi gentilmente cedido pelo Dr. Roger Chammas, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. As células B16-F10 foram mantidas em meio RPMI (Life Technologies, EUA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, Life Technologies, EUA) e antibiótico-antimicótico (Life Technologies, EUA) mantidos em estufa com ambiente umidificado, 37°C e 5% CO₂. A linhagem B16-GFP foi desenvolvida pelo Msc. Igor de Luna Vieira (Laboratório de Vetores Virais, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo). Brevemente, as células B16-F10 foram transduzidas com vetor lentiviral Lego-Gpuro-opt (gentilmente cedido por Kristoffer Reicken, University Medical Center, Hamburg, Germany) e posteriormente selecionada para resistência a puromicina, gerando a linhagem B16-GFP. Estas células foram mantidas nas mesmas condições descritas acima.

Para as culturas primárias das CTMs extraídas de medula óssea (CTM-MO) foi utilizado meio ALFA-MEM acrescido de 10% de FBS e 1% de antibiótico-antimicótico (Life Technologies). Para as CTMs extraídas do Tecido Adiposo (CTM-TA) foi utilizado DMEM-F12 acrescido de 20% de FBS e 1% de antibiótico-antimicótico (Life Technologies). Ambas foram mantidas em estufa com ambiente umidificada, 37°C e 5% de CO₂, conforme descrito em maior detalhe a seguir.

4.2. MANUSEIO DE ANIMAIS

Todos os procedimentos em animais foram previamente avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FM-USP, protocolo 177/14. Os animais utilizados nestes estudos foram camundongos C57BL/6 machos e fêmeas com 6 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e mantidos no Biotério Experimental do Centro de Medicina Nuclear (CMN- LIM 43) da Faculdade de Medicina da USP com acesso *ad libitum* a ração e água, ciclo de luz/escuro de 12hs e uso de microisoladores em estante ventilado. O bem-estar dos animais foi constantemente monitorado, quando necessário os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e obedecendo as normas do Centro de Bioterismo da FMUSP para os procedimentos de descarte dos animais.

4.3. ISOLAÇÃO DAS CTMs

4.3.1. CTMs PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA (CTM-MO)

As células mesenquimais provenientes da medula óssea foram obtidas do fêmur e da tíbia de camundongos C57BL/6 machos. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. As extremidades do fêmur e das tíbias foram cortadas e tampão fosfato PBS/0,5% FBS/2 mM EDTA foi injetado em uma das extremidades do osso com a ajuda de uma seringa e agulha, assim as células da medula óssea saíram na extremidade oposta. O *pool* de células da extração de 2 animais, foi submetido a centrifugação, 300g por 5 minutos, e as células foram ressuspensas em meio α -MEM (Life Technologies) acrescido de 10% FBS, colocadas em garrafas de T25 e em seguida foram armazenadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Após 24h as células não aderentes foram removidas e as aderentes (CTMs) foram mantidas com adição de meio novo, α -MEM, acrescido com 10% FBS e 1% penicilina/estreptomicina (P/S. Life Technologies). Durante três dias seguidos, a cada 72 horas, a placa foi lavada com tampão PBS e o meio de cultura trocado, de forma a remover gradativamente as hemácias e *debris* celulares oriundos da extração. Quando as células alcançaram 80% de confluência, as placas foram tripsinizadas (TrypLE, GIBCO) e a cultura expandida em garrafas T75. A partir deste ponto conta-se a primeira passagem, devendo ser congeladas até a passagem 4 para garantir a uniformidade dentre os outros experimentos que seguirão.

4.3.2. CTMs PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO (CTM-TA)

As células mesenquimais provenientes do tecido adiposo foram obtidas de camundongos C57BL/6 machos jovens. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Foi realizado um pequeno corte no dorso para assim separar a pele dos órgãos internos. Depois realizou-se uma raspagem da gordura que fica localizada na pele do animal. Após a raspagem, a gordura foi lavada com PBS contendo 2,5% de Antibiotico-Antimicótico (Life Technologies) e em seguida foram tratadas com collagenase 1 a 0,075% diluída em PBS (Life Technologies) por 30 minutos no agitador (shaker) a 37°C. Em seguida a ação da enzima foi bloqueada com Dulbecco's Modified Eagle Medium - Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12; Life Technologies) acrescido de 20% FBS, centrifugado a 300g por 10 minutos. O pellet foi ressuspensado em meio novo e colocado em garrafas de T75. A cada 48h, as células foram lavadas com PBS e adicionadas meio novo até atingir a confluência de 80%. A tripsinização, expansão,

contagem de passagens e criopreservação foram realizadas conforme descrito anteriormente.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS CTMs

A caracterização das CTMs foi realizada a partir da passagem 4 para as CTM-MO e passagem 3 para as CTM-TA, pois as células se encontram mais uniformes e sem vestígios de outros tipos de células (muito comum em culturas das CTM-MO), por análise de marcadores moleculares detectados por citometria de fluxo. Para isso, foram colocadas 1×10^5 CTMs, em microtubos de 1,5ml e acrescidos os anticorpos, da tabela 1 abaixo, em uma diluição 1:100 microlitros em solução PBS/BSA 1% (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) por 30 minutos em refrigeração e ambiente escuro. Após o tempo, foram feitas 3 lavagens com PBS, e o pellet foi ressuscitado em 500 microlitros de PBS e analisadas no citômetro de fluxo Attune (Life Technologies) pelo programa do próprio equipamento Attune® Cytometric Software.

Tabela 1: Tabela com alguns marcadores e suas funções utilizados na caracterização de células mesenquimais murinas.

Status das CTMs	Marcador	Função
Positivo	Sca-1-FITC-murino (#130-093-222, MACS)	Célula Tronco (<i>stemness</i>)
	CD29-FITC-murino (#22634D BD bioscience)	Integrina $\beta 1$ - leucócitos e células endoteliais
Negativo	CD11b-PE-murino (#130-091-730, MACS)	Marcador para monócitos e macrófagos
	CD31-FITC-murino (#561813, BD bioscience)	Marcador para células endoteliais.
	CD117-PE-murino (130-091-730, MACS)	Células progenitoras hematopoiéticas

	CD45-PerCP-Cyanine5.5-murino (#45-0451, Affimetrix)	Marcador de células hematopoiéticas
--	---	-------------------------------------

4.5. DIFERENCIAÇÃO DAS CTMs EM ADIPÓCITOS, CONDRÓCITOS E OSTEÓCITOS

Para a diferenciação das células tronco mesenquimais foram utilizados kits StemPRO, GIBCO, para diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Foram plaqueadas 1×10^4 células em placas de 6 poços, ao chegarem a confluência de 50% colocou-se o meio de diferenciação referente a cada kit.

Para a diferenciação em adipócitos foram necessários de 7 a 14 dias com o meio StemPRO *adipogenesis differentiation kit* GIBCO, após esse tempo a placa foi lavada com PBS, adicionado 1ml de paraformaldeído 4% por 20 minutos. Retirou-se o paraformaldeído e a placa foi lavada com água corrente lentamente. Adicionou-se 1ml do corante OilRed a 0,16% por 15 minutos, após esse tempo, lavou-se com água corrente e esperou-se a placa secar para observar no microscópio óptico.

Já para a diferenciação em condrócitos esperou-se 14 dias com o meio StemPRO *chondrogenesis differentiation kit* GIBCO, após esse tempo foi retirado o meio da placa e adicionou-se 1 ml de azul de toluidina a 1% por 2 minutos. Lavou-se a placa com água destilada e esperou-se 2 horas até a placa secar. Após isso foi adicionado 1 ml de etanol a 70% por 1 minuto, após esse tempo retirou-se o etanol a 70% e adicionou-se etanol a 90% também por 1 minuto. Retirou-se o etanol a 90% e adicionou-se etanol absoluto por 1 minuto. Esperou-se secar e observou-se em microscópio óptico.

Para a diferenciação em osteócitos utilizou-se o StemPRO *osteogenesis differentiation kit* GIBCO por 21 dias, após esse tempo lavou-se a placa com PBS e adicionou-se nitrato de prata a 1% e colocou-se na luz UV por 45 minutos. Em seguida lavou-se com PBS, e a placa foi tratada com tiosulfato de sódio a 3% por 5 minutos. Lavou-se com água destilada e corou-se com Van Gieson por 5 minutos (corante de Van Gieson é uma solução contendo fucsina a 1% e ácido pícrico saturado em água, para 100ml de corante Van Gieson utiliza-se 3,75ml de fucsina a

1% mais 46,25 ml de ácido pícrico saturado e 50 ml de água). Após corar, lavou-se com etanol absoluto por gotejamento. Esperou-se secar bem e foi observado no microscópio óptico

4.6. ENSAIOS FUNCIONAIS COM OS VETORES VIRAIS

4.6.1. ENSAIO DE EFICIÊNCIA DE TRANSDUÇÃO COM ADENOVÍRUS

Para a transferência dos genes de camundongo eGFP, IFN β e p19^{ARF} diretamente nas células tumorais, foram utilizados vetores adenovirais não replicativos, nos quais a expressão do transgene é controlada pelo promotor responsivo à p53. Estes vetores também contêm a fibra do capsídeo modificada com a inserção do tripeptídeo RGD, que proporciona a transdução de um amplo espectro de células alvo (21).

Todos os vetores AdRGD-PG foram desenvolvidos durante o mestrado da Dra. Aline Hunger Ribeiro (Processo FAPESP 2008/55963-0). O vírus Ad,RGD.CMV.LacZ foi gentilmente cedido pelo Dr. Hiroyuki Mizuguchi (Osaka University, Japan). Os vírus foram produzidos durante o doutorado do aluno João Paulo Portela Catani utilizando procedimentos já publicados por ele (56). Os estoques adenovirais apresentavam os seguintes títulos:

- Ad.RGD.PG.eGFP: Vetor controle que expressa eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), título: $2,75 \times 10^{11}$ pvu/ml.
- Ad.RGD.PG.LacZ: Vetor controle que expressa Lac Z (*enzima β -galactosidase*), título: 1×10^{11} pvu/ml.
- Ad.RGD.PG.IFN β : Vetor usado para expressão da proteína IFN β murina, título: $1,74 \times 10^{11}$ pvu/ml.
- Ad.RGD.PG.p19^{Arf}: Vetor usado para expressão da proteína p19^{Arf}, título $1,07 \times 10^{11}$ pvu/ml.

Para verificar a eficiência de transdução das CTMs com os vetores adenovirais, foi realizada uma curva de MOI (*multiplicity of infection*). As CTMs foram plaqueadas 5×10^4 células em placas de 6 poços, após 24h as células foram transduzidas com o Ad.RGD.PG.eGFP utilizando MOI 100, 250, 500, 750, 1000,

2000 ou 3000 em meio mínimo de DMEM-F12 com 2% de FBS por 4h. Em seguida, o meio foi retirado e colocou-se meio novo com FBS 20% sem vírus. Quando completou 24h de incubação, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e ressuspensas em 1 ml de PBS antes de serem observadas no citômetro de fluxo Attune (Life Technologies) e os resultados analisados pelo programa do próprio equipamento, Attune® Cytometric Software.

4.6.2. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CTMs TRATADAS COM OS VETORES AD.RGD.PG.eGFP, AD.RGD.PG.IFN β , AD.RGD.PG.P19^{Arf} E A COMBINAÇÃO AD.RGD.PG.IFN β + AD.RGD.PG.p19^{Arf}

Foram plaqueadas 5×10^4 células-troncos mesenquimais em placas de 6 cm e ao obter uma confluência de 80% as CTMs foram transduzidas com os seguintes vetores: Ad. RGD.PG.eGFP, Ad.RGD.PG.IFN β , Ad.RGD.PG.P19^{Arf}, sozinhos e combinados, nos MOIs totais de 1000 e 2000. As CTMs foram incubadas durante 24h, 48h, 72h antes de serem fotografadas no microscópio Evos FL (Thermo Fisher).

4.6.3. ELISA PARA IFN β MURINO

O sobrenadante do experimento descrito acima foi coletado e armazenado a -80°C até o momento de análise através de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para detecção da expressão do IFN β murino. Especificamente, o ELISA foi realizado com o sobrenadante das placas 48h após transdução. E o experimento foi realizado de acordo com o kit da PBL BIOMEDICAL e as microplacas foram lidas no leitor de placas VictorTm (Perkin-Elmer-EUA) na absorvância de 450nm.

4.6.4. ENSAIO DE MTT DAS CTMs TRATADAS COM OS VETORES AD.RGD.PG.eGFP, AD.RGD.PG.IFNB, AD.RGD.PG.P19^{Arf} E A COMBINAÇÃO AD.RGD.PG.IFN β + AD.RGD.PG.P19^{Arf}

O ensaio de MTT foi realizado em placas de 96 poços, onde foi plaqueado 1×10^3 CTMs e, no dia seguinte, transduzidas com os vetores Ad.RGD.PG.eGFP, Ad.RGD.PG.IFN β , Ad.RGD.PG.P19^{Arf}, sozinhos e combinados, nos MOIs totais de 1000 e 2000. Após 4 horas de transdução na presença de meio mínimo de DMEM-F12 acrescido de 2% de FBS, o meio foi trocado por DMEM-F12 mais 20% de FBS, sem vírus. As placas foram incubadas em estufas de CO₂ por 24h, 48h ou 96h e, em seguida, foi adicionado em cada poço 25 μ l da solução contendo MTT (3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5mg/ml de PBS). A placa foi incubada a 37°C por 4 horas. Em seguida foi adicionado a solução solubilizadora (20% SDS/50% DMF, pH 4,7) sendo posteriormente incubada a 37°C por 16 horas. Após esse período a placa foi lida em espectrofotometria no comprimento de onda de 570 nm.

4.6.5. CO-CULTURA DAS CTMs TRANSDUZIDAS COM AD.RGD.CMV.LACZ E/OU AD.RGD.PG.IFN β COM B16-GFP

Para a co-cultura, 1×10^5 CTMs foram transduzidas em placas de 6 cm com o vetor, Ad.RGD.CMV.LacZ e/ou Ad.RGD.PG.IFN β , de acordo com a Tabela 2 abaixo, por 6 horas em meio mínimo de DMEM F12 acrescido de 2% de FBS, após as 6 horas, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 1X para retirar o vírus, tripsinizada e as CTMs misturadas com células B16-GFP na proporção 1:1 (1 CTM para 1 B16-GFP). Ou seja, 1×10^4 CTM mais 1×10^4 B16-GFP foram plaqueadas em placa 6-pocos na presença de meio DMEM F-12 acrescido 20% de FBS. As placas foram fotografadas por até 96 horas (Evos, Thermo Scientific).

Tabela 2: Transdução de CTMs com Ad.RGD.CMV.LacZ (controle negativo) e/ou AD.RGD.PG.IFN β em preparação para co-cultura com B16-GFP.

Transdução CTM		
MISTURA	Vetor Ad.RGD.CMV.LacZ	Vetor Ad. RGD.PG.IFN β
Controle	(-)	(-)
LacZ 1000	MOI 1000	(-)
Lac Z 2000	MOI 2000	(-)
Interferon 1000 (IFN 1000)	MOI 500	MOI 500
Interferon 2000 (IFN 2000)	MOI 1000	MOI 1000

4.6.6. CO-CULTURA DAS CTMS TRANSDUZIDAS COM AD.RGD.CMV.LACZ E/OU AD.RGD.PG.IFN β EM CONJUNTO COM CÉLULAS B16 TRANSDUZIDAS COM AD.RGD.CMV.LACZ OU AD.RGD.PG.P19^{Arf}

Neste ensaio, 1×10^5 CTMs foram transduzidas em placas de 6cm com o vetor, Ad.RGD.CMV.LacZ e/ou Ad.RGD.PG.IFN β , de acordo com a Tabela 3 abaixo, por 6 horas em meio mínimo de DMEM F12 acrescido de 2% de FBS. Em paralelo, células $2,5 \times 10^5$ B16-GFP foram plaqueadas em placas de 6cm e transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ ou Ad.RGD.PG.IFN β de acordo com a Tabela 3. Após as 6 horas, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X para retirar o vírus, tripsinizadas e as CTMs misturadas com as B16-GFP na proporção de 1:9 (1 CTM para 9 B16-GFP). Ou seja, 5×10^3 CTM mais $4,5 \times 10^4$ B16-GFP foram plaqueadas em placa 6-poços na presença de meio DMEM F-12 acrescido 20% de FBS. A tabela 3 abaixo informa os MOIs utilizados e os grupos formados para a realização da co-cultura. As placas foram fotografadas por até 72 horas (Evos, Thermo Fisher).

Tabela 3: Transdução de CTMs ou B16-GFP com os vetores indicados em preparação de ensaio de co-cultura.

	Ad.RGD.CMV.LacZ	Ad.RGD.PG.IFN β
MSC LacZ	MOI 1000	(-)
MSC IFN	MOI 500	MOI 500
B16	(-)	(-)
B16 LacZ	MOI 1000	(-)
B16 p19 (MOI 75)	MOI 500	MOI 500

4.7. ENSAIOS *IN VIVO*

4.7.1. INFILTRAÇÃO DA CTM NO TECIDO TUMORAL

Camundongos C57BL/6 fêmeas foram implantadas s.c. com 1×10^5 células B16 em 100 μ l de PBS. Progressão tumoral foi monitorada e volume tumoral foi

mensurado com paquímetro 3-vezes por semana. Quando os tumores atingiram volume de 60 mm³, foi injetado na veia caudal dos animais 1x10⁵ CTMs previamente transduzidas com Ad.RGD.PG.eGFP (MOI 1000) em volume de 100 µl de PBS. Os animais foram mantidos durante 48 horas antes de serem eutanasiados e os tumores foram removidos, fixados com paraformaldeído 4% durante 4 horas e incubadas em solução de 30% sacarose durante 16 horas a 4°C. Em seguida, os tumores foram congelados na presença de OCT-Tissue Tek. Os cortes congelados foram realizados em criostato, secções de 4 µm foram gerados e colocadas em lamina silanizadas para avaliação por microscopia de fluorescência utilizando o Evos FL (Thermo Fisher).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos *in vitro* foram analisados pelo teste de *Student's t-test* com exceção do experimento de co-cultura das CTMs transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ e/ou Ad.RGD.PG.IFNβ em conjunto com células B16 transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ ou Ad.RGD.PG.p19^{Arf} o qual foi utilizado o teste Two-way Anova com pós-teste de *Bonferroni's Multiple Comparison Test*.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CTMs PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA (CTM-MO)

O isolamento de CTM foi inicialmente realizado a partir da medula óssea de camundongos C57BL/6 machos, conforme descrito nos Material e Métodos. As células aderentes foram lavadas a cada 72 horas e tripsinizadas ao chegar a 80% de confluência permitindo a eliminação de células em suspensão (mortas ou não aderentes) e uniformização da cultura CTM-MO. Na quarta passagem, as células extraídas da medula óssea foram avaliadas para expressão dos marcadores de CTM (CD29, SCA-1) e ausência de marcadores de linhagens hematopoiéticas (CD117, CD31, CD11b e CD45). Conforme demonstrado na Figura 3, as CTMs foram positivas para os marcadores Sca-1 e CD29 e negativas para os marcadores CD117, CD31, CD11b, CD45. Com esta caracterização inicial, foi considerado que as células derivadas da medula óssea são CTMs. Mesmo que as CTM-MO tenham sido isoladas com êxito, foi anotado que até chegar na 4ª passagem, quando se obteve uma cultura pura e uniforme, sem vestígios de outros tipos celulares, levou aproximadamente 3 meses, um tempo exorbitante que dificultou assim a expansão das células para ensaios posteriores.

Figura 3: Caracterização das células mesenquimais extraídas da medula óssea (CTM-MO). As CTM-MO foram incubadas com anticorpos específicos para os marcadores de CTM (CD29, Sca1) ou linhagens hematopoiéticas (CD117, CD31, CD11b, CD45) e observadas por citometria de fluxo. O pico preto representa células extraídas da MO não coradas (sem anticorpo), utilizadas como controle; picos coloridos representam CTM-MO marcadas com anticorpos.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS CTMs PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO (CTM-TA)

Na tentativa de isolar CTMs com maior ritmo de proliferação, foi utilizado o tecido adiposo de camundongos C57BL/6 machos. Após a terceira passagem, as células extraídas do tecido adiposo foram caracterizadas e verificada a expressão dos marcadores SCA-1, CD29, CD31, CD11b e CD45. As células analisadas foram positivas para os marcadores Sca-1 e CD29 e negativa para os marcadores CD31, CD11b, CD45 (Figura 4). Esta caracterização parcial sugere que as células isoladas são as CTMs.

Para saber até que passagem pode ser utilizada as CTMs provenientes do tecido adiposo, sem haver perda da sua característica de célula tronco, foram comparados os marcadores, positivos e negativos, entre a 3ª passagem e a 8ª passagem (Figura 4). Na 8ª passagem, as CTMs exibem menor marcação de Sca-1 e o CD29 aumenta levemente sua expressão, já a expressão dos demais marcadores não foi alterada. Com este resultado, não é aconselhável a utilização das CTMs após a 8ª passagem, pois a alteração dos marcadores, SCA-1 e o CD29, poderia indicar a perda da característica de célula-tronco.

Figura 4: Caracterização das células mesenquimais extraídas do tecido adiposo (CTM-TA). Comparação dos marcadores de superfície entre as passagens 3 e 8. As células foram coradas com anticorpos específicos para o marcador indicado e avaliadas por citometria de fluxo. Controles, células sem exposição para anticorpo. 3P, terceira passagem. 8P, oitava passagem.

5.3. DIFERENCIAÇÃO DAS CTMs

Para a diferenciação em adipócitos foram necessários 14 dias com o meio StemPRO *adipogenesis differentiation kit* GIBCO. Foi corada com OilRed O a 0,16% o qual marca gotículas de gordura que são evidenciadas através de pequenas estruturas circulares coradas de vermelho-marrom. Na figura 5A, apontamos o controle negativo (corado, mas sem a presença do meio de diferenciação, o meio utilizado foi o DMEM-F12 acrescido de 20% de FBS), e a figura 5D a diferenciação em adipócitos. Nota-se alterações na estrutura das células, contudo a coloração para gordura ficou fraca. Portanto, podemos concluir que houve diferenciação em adipócitos, mas deve-se ter um aprimoramento no processo de coloração.

Já para a diferenciação em condrócitos esperou-se 14 dias com o meio StemPRO *chondrogenesis differentiation kit* GIBCO, e foi corado com azul de toluidina a 1%. A marcação de cartilagem evidenciada através de uma coloração intensa de azul-rosado. No presente estudo, nota-se alterações na estrutura das células compatíveis para um modelo positivo para diferenciação condroblastos, figura 5E, em comparação com o controle

não diferenciado, figura 5B. A coloração não saiu como esperado, a marcação em azul saiu fraca. Devendo-se aprimorar tanto na técnica de diferenciação quando na coloração.

Para a diferenciação em osteócitos utilizou-se o StemPRO *osteogenesis differentiation kit* GIBCO por 21 dias, utilizando o método de Van Kossa com nitrato de prata a 1% e posteriormente corado com Van Gieson. A marcação de tecido ósseo é evidenciada através de áreas grandes de marcação em vermelho-marrom, relativos à presença de íons de Ca^{2+} . Na figura 5F, nota-se alterações na estrutura das células diferenciadas, bem como uma coloração de regiões espaciais na forma esperada. No controle negativo não diferenciado, figura 5C, observa-se somente a coloração nos núcleos que pode ser devida ao caráter ácido do mesmo. Portanto, houve diferenciação em osteoblastos. A ausência da cor vermelha-marrom, foi devido as fotos terem sido tiradas com filtro azul.

Figura 5: Diferenciação das CTMs. As microfotografias foram tiradas no EVOS no aumento de 20x. As figuras A,B,C são os controles respectivamente de D,E,F no qual o D é a diferenciação em adipócito, o E é a diferenciação em condrócito e o F é a diferenciação em osteócito.

5.4. EFICIÊNCIA DE TRANSDUÇÃO COM ADENOVÍRUS

Com o objetivo de verificar a eficiência de transdução com o adenovírus, foi utilizado o Ad.RGD.PG.eGFP que expressa a proteína fluorescente verde (eGFP, do inglês *enhanced green fluorescent protein*). Foi realizada uma curva de MOI (*multiplicity of infection*) onde as CTM-TA foram transduzidas com MOIs variando entre 100 e 5000 (Figura 6). Foi observado que, de maneira geral, o número de CTM positivas para eGFP aumenta ao decorrer do tempo após a transdução e a expressão viral chega até o nível máximo a partir de 48 horas. Foi observada uma resposta dose dependente entre MOI 1000 e 3000. Com o MOI de 1000 obteve-se quase 75% das células GFP-positivas, 48 horas após transdução. Enquanto MOI 2000 e 3000 oferecem maiores níveis de transdução (aproximadamente 80% e 90%, respectivamente), MOI 4000 e 5000 não melhorou a eficiência de transdução. Mesmo sendo desejável a transdução do maior número de células possíveis, também se preocupa com a resposta celular ao processo de transdução. Ou seja, o MOI a ser utilizado nos ensaios posteriores não deve ocasionar mudanças não desejáveis, como alteração de morfologia ou proliferação, devido ao vetor em si.

Figura 6: Transdução das CTMs com Ad.RGD.PG.eGFP em diferentes MOIs. CTM-TA foram transduzidas com o vetor adenoviral utilizando o MOI indicado. Após 24/48/72 horas de incubação, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo. Experimento realizado em 6 ensaios biológicos, utilizando o teste estatístico *Student's t-test*, *** $p < 0,001$.

5.5. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CTMs FRENTE AOS VETORES AD.RGD.PG.eGFP, AD.RGD.PG.IFN β , AD.RGD.PG.p19^{Arf} E A COMBINAÇÃO AD.RGD.PG.IFN β , AD.RGD.PG.p19^{Arf}

Foi avaliada a alteração morfológica de células CTM-TA após transdução com os vetores adenovirais. Foi utilizado MOI de 1000 e 2000, pois esses MOIs permitiram uma eficiência de transdução relativa para transduzir as CTMs. As CTMs foram observadas e fotografadas 24, 48, e 72 horas após a transdução, conforme mostrado nas Figuras 7, 8 e 9, respectivamente. Tratamento com Ad.RGD.PG.eGFP não induziu notável alteração morfológica mesmo 72 horas após transdução com MOI 2000, indicando que a transdução em si foi bem tolerada pelas CTMs. Nesta condição, as CTMs permaneceram com morfologia fusiforme ou com pequenas células refringentes. Porém, o tratamento com Ad.RGD.PG.p19^{Arf} resultou em alteração morfológica a partir de 48 horas após a transdução. Foi notado redução no número de células, modificação morfológica: células alargadas e ainda formações refringentes, mas com tamanho maior do que visto nos controles. A combinação de p19^{Arf} e IFN β exacerbou as alterações notadas com a aplicação de somente p19^{Arf}. Em contraste, o tratamento com Ad.RGD.PG.IFN β sozinho não foi associado com alterações morfológicas drásticas. Estes resultados indicam que o uso da combinação de p19^{Arf} e IFN β nas CTM é prejudicial para essas células carreadoras. Embora inicialmente tinha-se como objetivo usar a combinação dos dois vetores, esse objetivo teve de ser alterado devido à alta toxicidade gerada. Os resultados até agora foram condizentes com o esperado.

Figura 7: Observação morfológica 24 horas após transdução das CTMs com os vetores adenovirais. CTM-TA foram transduzidas com Ad.RGD.PG.eGFP (GFP), Ad.RGD.PG.IFN β (IFN), Ad.RGD.PG.P19^{Arf} (P19) e a combinação Ad.RGD.PG.IFNB + Ad.RGD.PG.P19^{Arf} (IFN+P19) utilizando um MOI de 1000 ou 2000 total. No caso de aplicação de dois vetores virais, cada vetor representa metade do MOI (ex., 500 + 500; 1000 + 1000). Após 24 horas de incubação, as células foram fotografadas no microscópio Evos, na objetiva de 10x.

Figura 8: Observação morfológica 48 horas após transdução das CTMs com os vetores adenovirais. CTM-TA foram transduzidas com Ad.RGD.PG.EGFP (GFP), Ad.RGD.PG.IFN β (IFN), Ad.RGD.PG.P19^{Arf} (P19) e a combinação Ad.RGD.PG.IFN β + Ad.RGD.PG.P19^{Arf} (IFN+P19) utilizando um MOI de 1000 ou 2000 total. No caso de aplicação de dois vetores virais, cada vetor representa metade do MOI (ex., 500 + 500; 1000 + 1000). Após 48 horas de incubação, as células foram fotografadas no microscópio Evos, na objetiva de 10x.

Figura 9: Observação morfológica 72 horas após transdução das CTMs com os vetores adenovirais. CTM-TA foram transduzidas com Ad.RGD.PG.EGFP (GFP), Ad.RGD.PG.IFN β (IFN), Ad.RGD.PG.P19^{Arf} (P19) e a combinação Ad.RGD.PG.IFN β + Ad.RGD.PG.P19^{Arf} (IFN+P19) utilizando um MOI de 1000 ou 2000 total. No caso de aplicação de dois vetores virais, cada vetor representa metade do MOI (ex., 500 + 500; 1000 + 1000). Após 72 horas de incubação, as células foram fotografadas no microscópio Evos, na objetiva de 10x.

5.6. ELISA PARA IFN β MURINO

Sendo que se pretende utilizar as CTMs como fontes de expressão de IFN β , torna-se imprescindível a verificação de sua produção após transdução com Ad.RGD.PG.IFN β . Para isto, as CTM-TA foram transduzidas com Ad.RGD.PG.eGFP (como controle) ou Ad.RGD.PG.IFN β com MOI de 1000 ou 2000, incubadas durante 48 horas e o sobrenadante foi recolhido. Foi realizado o Elisa para IFN β murino e, como observa-se na Figura 10, ocorre produção de interferon β pelas CTMs de maneira dose-dependente somente com aplicação do vetor que codifica este fator.

Figura 10: Ensaio de Elisa para detecção de IFN β murino. CTM-TA foram transduzidas com o vetor e MOI indicado e o sobrenadante foi coletado após 48 horas de incubação. Foi utilizado o kit da PBL BIOMEDICAL e as microplacas foram analisadas no leitor de placas Victor[™] (Perkin-Elmer-EUA) na absorvância de 450nm. O experimento foi realizado em triplicata, teste estatística, *Student's t-test*, * $p < 0,05$.

5.7. ENSAIO DE MTT DAS CTMS FRENTE AOS VETORES AD.RGD.PG.EGFP, AD.RGD.PG.IFN β E A COMBINAÇÃO AD.RGD.PG.IFN β MAIS AD.RGD.PG.P19^{Arf}

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular, utilizou-se o ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, na qual desidrogenases mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas clivam o anel de tetrazólio. Neste caso, o composto de cor amarela se torna azul escuro, formando cristais de formazan {E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan} que coram as células.

As CTMs transduzidas com os vetores Ad.RGD.PG.eGFP, Ad.RGD.PG.IFN β e a combinação Ad.RGD.PG.IFN β mais Ad.RGD.PG.p19^{Arf} foram avaliadas pelo ensaio de MTT. Como demonstrado na Figura 11, o tratamento com Ad.RGD.PG.IFN β sozinho ou em combinação com Ad.RGD.PG.p19^{Arf} reduziu a atividade mitocondrial das CTMs. O tratamento com Ad.RGD.PG.p19^{Arf} foi realizado, mas gerou resultados inconsistentes (dados não mostrados). Foi notado que o ensaio MTT revelou resposta celular frente tratamento com IFN β que não foi evidente no ensaio de avaliação morfológica.

Figura 11: Ensaio de MTT para medir resposta de CTM após transdução. As CTMs foram transduzidas com os vetores Ad.RGD.PG.eGFP (GFP), Ad.RGD.PG.IFN β (IFN) e a combinação Ad.RGD.PG.IFN β + Ad.RGD.PG.P19^{Arf} (IFN+P19). A viabilidade celular /atividade mitocondrial das CTMs foram analisadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O experimento foi realizado em triplicata biológica e utilizou-se o teste estatístico, *Student's t-test*, NS=não significativo, *** $p < 0,001$.

5.8. CO-CULTURA DAS CTMs TRANSDUZIDAS COM AD.RGD.CMV.LACZ E/OU AD.RGD.PG.IFN β COM B16-GFP

Até este ponto, foi verificado o impacto de IFN β nas próprias CTMs, porém procura-se avaliar o efeito do IFN β produzido pelas CTMs transduzidas sobre as células tumorais. Para isto, CTMs transduzidas com o Ad.RGD.CMV.LacZ ou Ad.RGD.PG.IFN β foram co-cultivadas com células de melanoma murino, B16-GFP, que expressam eGFP constitutivamente. As co-culturas foram fotografadas, as CTMs (células não coradas) ou as células tumorais (células verdes) foram quantificadas através do programa imagem J. Na Figura 12A são demonstradas as fotomicrografias. A quantificação demonstrada na Figura 12B e 12C revela que o número de CTM presente na co-cultura 96-horas não foi reduzida de maneira significativa. Em contraste, o número de células B16-GFP foi drasticamente reduzido na presença de CTM expressando IFN β . Considera-se importante ressaltar que a co-cultura, neste caso, foi plaqueada com proporção 1:1 entre CTM e B16-GFP. Como visto a seguir o uso de menor proporção de CTM transduzidas com Ad.RGD.PG.IFN β ainda apresenta efeito anti-tumoral.

12A

12B

Figura 12: Co-cultura CTM transduzida com Ad.RGD.PG.IFN β mais B16-GFP. (12A) Imagens exemplares do experimento de co-cultura da CTM transduzida com Ad.RGD.CMV.LacZ (LacZ) e/ou Ad.RGD.PG.IFN β (IFN) com B16-GFP. MSC, mesenchymal stem cell (CTM). Microscópio Evos, na objetiva de 10x. (12B) Quantificação de CTM (MSC) e (12C) B16-GFP a partir do ensaio de co-cultura. As CTMs (MSC, *mesenchymal stem cells*) foram transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ (LacZ) ou Ad.RGD.PG.IFN β (IFN) ou não (Controle) e logo em seguida a co-cultura com B16-GFP foi plaqueada na proporção 1:1. Após 96 horas de incubação, as fotomicrografias foram realizadas com uso do microscópio EVOS FL (Thermo Fisher) utilizando objetiva de 10x. O número de células não marcadas (MSC) foi quantificada e demonstrada no gráfico de cima enquanto o número de células GFP-positivas (B16-GFP) também foi quantificado e demonstrado no gráfico de baixo. Ressalta-se que, no gráfico 12C, os rótulos para cada coluna se refere a condição de transdução das CTMs (MSC), que foram co-cultivadas com as células tumorais (B16-GFP). O experimento foi realizado em triplicata, e o teste estatístico *Student's t-test*, $p < 0,001$.

5.9. CO-CULTURA DAS CTMS TRANSDUZIDAS COM AD.RGD.CMV.LACZ (CONTROLE NEGATIVO) E/OU AD.RGD.PG.IFN β E/OU AD.RGD.PG.P19^{Arf} COM B16-GFP

No próximo passo, foi avaliada a influência de IFN β sobre células tumorais no ensaio de co-cultura, mas neste caso a proporção foi de nove células tumorais para cada uma CTM. E ainda, foi explorada a possibilidade do p19^{Arf} conferir sensibilização para as células tumorais frente sua exposição para IFN β . Para isto, as CTMs foram transduzidas ou não com Ad.RGD.CMV.LacZ ou Ad.RGD.PG.IFN β .

Em paralelo, B16-GFP foram transduzidas ou não com Ad.RGD.CMV.LacZ ou Ad.RGD.PG.p19^{Arf}. Logo em seguida, as co-culturas foram montadas na proporção 1:9 (CTM: B16-GFP) e incubadas. Replicatas foram fotografadas 24, 48 e 72 horas após montagem da co-cultura e contadas com o programa Image J. Como demonstrado na Figura 13, o número de células tumorais foi reduzido mesmo utilizando a proporção de 1:9 (CTM expressando IFN β para B16-GFP). Também foi observado que p19^{Arf} reduziu o número de células tumorais. Porém, a presença de p19^{Arf} nas células tumorais deixou estas mais sensíveis à ação de IFN β fornecida pelas CTMs.

Figura 13: Quantificação de B16-GFP a partir do ensaio de co-cultura. As CTMs (MSC, *mesechymal stem cells*) foram transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ (LacZ) ou Ad.RGD.PG.IFN β (IFN). Em paralelo, células B16-GFP foram transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ ou Ad.RGD.PG.p19^{Arf}. Logo em seguida a co-cultura foi montada na proporção 1:9 (CTM:B16-GFP). As fotomicrografias foram realizadas com uso do microscópio EVOS FL (Thermo Fisher) utilizando a objetiva de 10x. O número de células GFP-positivas (B16-GFP) foi quantificada com o programa Image J, e demonstrado no gráfico. Ressalta-se que os rótulos para cada linha se refere a condição de transdução das MSC que foram co-cultivadas com as células tumorais (B16-GFP). O experimento foi realizado em triplicata e utilizado o teste estatístico *Student's t-test*, $p < 0,001$.

5.10. HOMING DE CTMs AO SÍTIO TUMORAL

Em preparação para um ensaio *in vivo* e verificação da sensibilização de células tumorais a IFN β expressa pelas CTMs, foi primeiramente explorado a infiltração de CTM em tumores B16. Para este ensaio piloto, células B16-F10 foram

implantadas s.c. em camundongos C57BL/6 fêmeas e a formação do tumor foi observada. Assim que o tumor se tornou palpável, CTMs previamente transduzidas com Ad.RGD.PG.eGFP foram injetadas na veia caudal. Após 48 horas, os animais foram eutanasiados, os tumores recolhidos e processados para observação das células GFP-positivas, sendo as CTMs. Como demonstrado na Figura 14, pode-se afirmar a presença de CTM carreando o Ad.RGD.PG.eGFP, indicando que a CTM tem o potencial de migração ao foco tumoral nas condições utilizadas neste ensaio.

Figura 14: Corte transversal do tumor B16-F10 após injeção sistêmica de CTMs. Células B16-F10 foram injetadas via subcutânea em animais C57BL/6. Após o tumor se tornar palpável, CTM transduzidas com Ad.RGD.CMV.LacZ ou Ad.RGD.PG.eGFP foram inoculadas via sistêmica. Após 48 horas, os animais foram eutanasiados e os tumores recolhidos, fixados e congelados. Cortes congelados foram corados com DAPI e observados em microscopia de fluorescência (EVOS FL, Thermo Fisher). a) Tumor B16-F10, animal tratado com CTM expressando LacZ. b) Tumor B16-F10, animal tratado com CTM expressando eGFP. Microscópio Evos, na objetiva de 10x.

6. DISCUSSÃO

O melanoma possui uma alta possibilidade de metástase, por isso é mais grave que os casos de câncer de pele não-melanoma. Um paciente em estágios avançados, tem em média uma sobrevida de 6 a 9 meses (57).

Quando diagnosticado precocemente, o tratamento do melanoma é através de excisão cirúrgica, casos mais avançados utiliza-se quimioterapia e radioterapia. A terapia sistêmica, como a quimioterapia, permanece insatisfatória, induzindo respostas duradouras completas em uma pequena minoria de pacientes. A quimioterapia atinge tanto as células em divisão quanto as tumorais, por isso pesquisadores buscam uma forma mais específica de tratamento destinado apenas ao tumor [3].

O uso do IFN β aliado à quimioterapia com o intuito de promover uma ativação da resposta adaptativa do sistema imune já foi um bom aliado em alguns tipos de melanoma, porém o tratamento com o interferon beta recombinante torna-se diversas vezes ineficaz por sua farmacocinética, por possuir uma baixa meia-vida na circulação, de aproximadamente, 5 minutos, além de muitos nódulos terem pouca vascularização, o que dificulta o acesso do IFN ao tumor. Outra desvantagem quanto ao uso do IFN são os efeitos colaterais, febre, calafrios, anorexia e fadiga progressiva, neutropenia, e/ou trombocitopenia; alguns receptores sofrem de mialgia e efeitos no sistema nervoso central. Estes efeitos tóxicos estão relacionados à intensidade do tratamento, dose, frequência da dosagem e duração (58).

Uma das formas de tratamento do melanoma e uma alternativa às desvantagens acima mencionadas é através do uso do adenovírus recombinante que expressa constitutivamente o IFN β . O adenovírus é um dos vetores mais comumente usados na terapia gênica e bem explorado pelo grupo de vetores virais no ICESP-USP. A fibra Ad5 foi modificada com a inserção do tripeptídeo RGD, sendo capaz de infectar células que não expressam CAR, cerca de 100-1000 vezes mais eficiente do que o vírus contendo a fibra de tipo selvagem. Além da inserção do RGD, Bajgelman e Strauss (2008) desenvolveram um adenovírus com um promotor responsivo à p53, o que aumentou os níveis de expressão do transgene até 5 vezes mais do que visto com o promotor constitutivo. Para finalizar o vetor adenoviral, foi realizada a inserção dos transgenes que são o IFN β , formando assim o vetor Ad.RGD.PG.IFN β , e o p19^{Arf} gerando o vetor Ad.RGD.PG.p19^{Arf} (55), que desempenham, respectivamente, papel de

imunomodulação, citotoxicidade e de supressor tumoral, atuando na inibição do crescimento celular descontrolado devido a ativação de oncogenes, ativando o fator de transcrição p53 e desencadeando a parada do ciclo celular (34).

No trabalho de Merkel (2013), a transferência *in situ* de um gene supressor de tumor (p19^{Arf}) associado com um gene imuno modulador (IFN β) tornou as células de melanoma murino mais susceptíveis à morte celular comparado com o tratamento isolado do Ad.PG.IFN β e o Ad.PG.p19^{Arf} tanto *in vitro* quando *in vivo* (29).

Porém ao utilizar o vetor adenoviral como tratamento pela via sistêmica, a maior parte das partículas de vetores adenovirais, Ad5, são sequestrados para o fígado, os hepatócitos são facilmente transduzidos e/ou o vírus é fagocitado pelos macrófagos residentes no fígado, células de Kupffer (KCs), causando toxicidade, resposta inflamatória, e assim reduzindo a dose eficaz de vírus, restringindo o vetor adenoviral para protocolos clínicos (59).

Devido à alta taxa de inativação das partículas virais após inoculação sistêmica é necessário buscar alternativas capazes de mascarar essas partículas. Uma forma de mascarar e dirigir a partícula viral até o foco tumoral é utilizando a CTM. Estudos demonstraram que as CTMs são capazes de dar suporte a hematopoiese e podem modular respostas imunes. Interessantemente, CTMs exibem um comportamento dirigindo para o tecido danificado, locais inflamatórios, e locais de tumor. Outra característica das CTMs é a sua baixa imunogenicidade devido à falta de expressão de moléculas co-estimuladoras. Deste modo, as CTMs não ativam a resposta imunológica do hospedeiro. A atividade de direcionamento da CTM para o local do tumor facilita a sua utilização como veículos celulares para a distribuição de agentes anti-tumorais (54).

Porém as CTMs contribuem para o desenvolvimento tumoral através da supressão da resposta imune, promoção de metástase e mediação na transição epitélio-mesenquima (EMT), como dito anteriormente (54). Esse fato foi verificado por Studeny M. *et al*, (2002), o qual extraiu CTM-MO de indivíduos saudáveis, marcou com *dye SP-Dil fluorescence* e injetou CTM-MO mais A375SM (linhagem de câncer de pulmão) subcutâneamente em camundongos nudes. Verificou, assim, que as células tumorais induziam a proliferação das CTMs e que uma porção significativa das CTMs era incorporada na arquitetura tumoral, levando formação de cápsula fibrosa na periferia do tumor, contribuindo para a formação do estroma tumoral (60). As CTMs têm sido utilizadas como veículo de agentes terapêuticos, como IFN- β (em

câncer de pâncreas, próstata, mama e melanoma), TRAIL (utilizado em gliomas, câncer de pâncreas e metástase pulmonar) e IL-12 (uso em carcinomas de células renais), tendo sua relevância devido ao seu potencial de migração ao sítio tumoral (61-65).

Com base na literatura isolamos células-tronco mesenquimais da medula óssea inicialmente para servirem como veículos para carrear os vetores adenovirais já utilizados no tratamento do melanoma murino, que são o Ad.RGD.PG.IFN β e o Ad.RGD.PG.p19^{Arf}.

O isolamento de CTM da medula óssea foi de fácil acesso e rápido, porém a cultura celular mesmo depois de diversas lavagens e passagens ainda não se apresentava pura, com a presença de muitas células hematopoiéticas. Pela baixa quantidade de CTM e alta quantidade de contaminantes a cultura tardou muito a desenvolver e proliferar. A frequência de CTM em MO é baixa, representa entre 0,001% a 0,01% da fração celular da MO. Com base no tempo de espera para estabelecer uma cultura pura, outra fonte de isolamento foi selecionada, a extração de CTM a partir do tecido adiposo, qual é 10 vezes mais abundante em CTM comparado ao de medula óssea. A extração foi bem simples, através da digestão com a collagenase tipo 1 e a cultura das células-tronco se desenvolveu mais rápido do que das CTM-MO, em 20 dias foi obtida uma cultura para prosseguir os experimentos (66-68).

Na caracterização das CTMs, tanto as extraídas da medula óssea quanto do tecido adiposo foram positivas para os marcadores Sca-1 e CD29 e negativas para os marcadores CD31, CD11b, CD45, em conformidade com a literatura. Infelizmente não existe um único marcador que comprove a presença das CTMs (48, 69).

Apesar da caracterização da CTM-MO ter saído conforme esperado, prosseguiu-se com o isolamento e cultura da CTM-TA pela sua proliferação mais ativa em comparação com a CTM-MO. Já que as CTM-TA desenvolvem mais rapidamente, comparamos a caracterização entre as passagens 3 e 8, e foi observado que a partir da 8ª passagem, as CTMs-TA começaram a perder a sua característica de tronco, o marcador SCA-1 começou a perder a sua positividade e o CD29 começou a se alterar, tornando-se mais positivo. Tais dados corroboram com os estudos de Mitchell J.B. *et al* (2006), que demonstraram que as características fenotípicas das CTM-TA mudam com sucessivas passagens, os marcadores associados ao estroma (CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD166) são baixos, e aumentam significativamente no decorrer da cultura (70, 71).

Estudos recentes de Davies *et al* (2015), apontam que o aumento da população CD29⁺/CD90⁺ também está relacionado com a diminuição da expressão de genes responsáveis pela pluripotência das células tronco (Lin28, Sox2 e Nanog). Esses genes representam fatores de pluripotência requisitados na manutenção e no potencial de auto-renovação das células tronco, que podem ser transfectadas, juntamente com OCT4, para induzir reversão para um estado pluripotente induzido. Corroborando com esses dados de expressão gênica, Davies *et al*, também demonstrou que CD29⁺/CD90⁺ aumentou significativamente a capacidade de CTM-MO e CTM-TA para diferenciar em osteócitos/adipócitos, de acordo com o seu nicho, respectivamente. Tais resultados foram apresentados comparando as passagens 0 e 1 das CTM-MO e CTM-TA extraídas de camundongos. Tomando os achados de Davies como base para o nosso resultado, o aumento da positividade do CD29 (comparando o marcador na passagem 3 com a passagem 8) indica que a célula está perdendo a sua característica de tronco e possivelmente indo a um estágio de diferenciação. Assim foi evitado utilizar, nos experimentos posteriores, CTMs com altas passagens (72).

Com esse conjunto de dados relacionados à caracterização das mesenquimais, foi decidido trabalhar com até a 6ª passagem. Evitando assim perder a característica de tronco das CTMs.

Com o objetivo de testar o efeito biológico da CTM-TA frente aos adenovírus, foi desenvolvido o ensaio de eficiência de transdução, o qual apontou um MOI elevado, 1000 e 2000, para uma expressão satisfatória do gene eGFP. Porém, estudos feitos por Studeny M. *et al* (2002), o qual utilizou CTM-MO, extraídas de indivíduos saudáveis, como veículo para entrega de IFN β humano para tratamento de metástases no pulmão, utilizou um MOI de 3000 do Ad5IFN β , MOI considerado para ele satisfatório, para os experimentos. O mesmo MOI de estudo foi utilizado para transdução de CTM-TA por Lamfers M. *et al* (2009). Concluindo assim que as CTMs necessitam de um MOI elevado para expressam do transgene (60, 73).

Studeny M. *et al* (2002), também realizou o experimento de co-cultura, CTM-MO mais A375SM (câncer de pulmão). E percebeu que ao cultivar as A375SM com a CTM-MO transduzida com Ad5IFN β no período total de 72h ocorria uma inibição de 50% do crescimento da célula tumoral, A375SM, comparado com o controle sem tratamento (CTM-MO não transduzida mais A375SM), e com a

A375SM cultivada sozinha, sendo que tal experimento foi analisado por citometria de fluxo (60).

Wang GX *et al* (2012), realizou co-cultura em um sistema de cultura *transwell*. A co-cultura de células PC-3 com CTM mais Ad5-IFN inibiu significativamente o crescimento das células PC-3 em comparação com co-cultura com CTMs transduzidas com vetor controle ou não modificadas (74).

No nosso experimento de co-cultura observamos resultados parecidos com Studeny M. *et al*, (2002) e Wang GX *et al*, (2012). O IFN β (MOI 1000) inibiu o crescimento tumoral, das células B16, consideravelmente. Porém conseguimos uma porcentagem maior de inibição com o tratamento combinado, CTM transduzida com Ad.RGD.PG.IFN β (MOI 500) + Ad.RGD.PG.lacZ (MOI 500) mais as células B16 sendo tratadas previamente com o Ad.RGD.PG.p19^{Arf} (MOI 75).

Como base para o futuro experimento *in vivo*, o Wang GX *et al* (2012), utilizou duas doses de CTM-Ad5-IFN β , 2×10^6 células/dose e 2×10^5 células/dose, administrada via sistêmica, para o tratamento de câncer de próstata, o qual foi induzido por células PC3. Ambas as doses prolongaram significativamente a sobrevida dos animais em comparação com os controles não tratados, porém não obteve diferença significativa entre as duas doses. Além disso, o tratamento com IFN β recombinante, só o vírus Ad5-IFN β , CTM transduzida com vetor controle ou só CTMs não obteve efeito significativo sobre a sobrevida dos animais em comparação com o controle não tratado. As suspensões de células e vírus foram injetadas por via intravenosa três vezes, em cada grupo em intervalos semanais, já o IFN β recombinante foi injetado subcutaneamente a cada dois dias durante todo o experimento (74).

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Pode-se concluir que: a cultura das CTMs proveniente de medula óssea (CTM-MO) requer mais tempo para a obtenção de uma população “pura”, por conter mais contaminantes (diversos tipos celulares) em comparação com a cultura das CTMs extraídas de tecido adiposo (CTM-TA). Assim, optou-se por trabalhar com as CTM-TA. Com a caracterização realizada por citometria de fluxo observou-se que independente do local da extração, as CTM-TA apresentam os mesmos marcadores (anticorpos marcados como positivos e negativos) que as células CTM-MO. A caracterização através da diferenciação das CTMs através do meio de diferenciação específico, para a obtenção de adipócitos, condrócitos e osteócitos foi realizada e constatou que as CTM-TA têm capacidade de diferenciação condizente com células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Foi observado que as CTM-TA são de difícil transdução, por isso são necessários MOIs altos, comparado com outros tipos celulares. A transdução das CTM-TA com a combinação Ad.RGD.PG.IFN β mais Ad.RGD.PG.p19^{Arf} levou a uma modificação da morfologia celular das CTMs em 48h e 72h após a transdução. No ensaio de co-cultura, a B16 foi cultivada com a CTM-TA transduzida com o vetor expressando IFN β , o que reduziu o número de células tumorais, porém ao sensibilizar as células tumorais, B16, com p19^{Arf} e cultivá-las com CTM-TA transduzida com o vetor expressando IFN β houve uma redução de células tumorais ainda maior. No experimento *in vivo*, observou-se o sucesso que as CTM-TA transduzidas com vetor adenoviral expressando eGFP apresentaram tropismo ao sítio tumoral. Espera-se que na fase de experimentação *in vivo*, o tratamento das CTMs expressando o IFN- β , em conjunto com o tratamento *in situ* do Ad.RGD.PG.p19^{Arf}, iniba a progressão tumoral, aumentando a eficiência do tratamento e diminuindo a probabilidade de o vetor ser neutralizado pelo sistema imune. Este estudo serve não só para implementar e padronizar a tecnologia das CTMs no Laboratório de Vetores Virais mas também abre a possibilidade de explorar a biologia destas como carreadora de vetores virais.

8. REFERÊNCIAS

1. (INCA) INdCJAGdS. 2013; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>.
2. Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Nov 1;224(3):241-8.
3. Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer*. 2007 Feb 1;109(3):455-64.
4. Verma IM, Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature*. 1997 Sep 18;389(6648):239-42.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
6. Wiley. 2013; Available from: www.wiley.co.uk/genmed/clinical.
7. Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Mar;98(5):298-300.
8. Khare R, Chen CY, Weaver EA, Barry MA. Advances and future challenges in adenoviral vector pharmacology and targeting. *Curr Gene Ther*. 2011 Aug;11(4):241-58.
9. Khare R, May SM, Vetrini F, Weaver EA, Palmer D, Rosewell A, et al. Generation of a Kupffer cell-evading adenovirus for systemic and liver-directed gene transfer. *Mol Ther*. 2011 Jul;19(7):1254-62.
10. ROWE WP, HUEBNER RJ, GILMORE LK, PARROTT RH, WARD TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953 Dec;84(3):570-3.
11. Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*. 2009 Jan;90(Pt 1):1-20.
12. Duffy MR, Parker AL, Bradshaw AC, Baker AH. Manipulation of adenovirus interactions with host factors for gene therapy applications. *Nanomedicine (Lond)*. 2012 Feb;7(2):271-88.
13. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*. 2000 Nov;81(Pt 11):2573-604.
14. Roy-Chowdhury J, Horwitz MS. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. *Mol Ther*. 2002 Apr;5(4):340-4.
15. Leppard KN. E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. *J Gen Virol*. 1997 Sep;78 (Pt 9):2131-8.
16. Lichtenstein DL, Toth K, Doronin K, Tollefson AE, Wold WS. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int Rev Immunol*. 2004 2004 Jan-Apr;23(1-2):75-111.
17. Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*. 2004 Feb;6 Suppl 1:S164-71.
18. Chiou SK, Tseng CC, Rao L, White E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol*. 1994 Oct;68(10):6553-66.
19. Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WS. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol*. 1996 Apr;70(4):2296-306.
20. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977 Jul;36(1):59-74.
21. Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA, et al. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther*. 2001 May;8(9):730-5.

22. Hammer K, Kazcorowski A, Liu L, Behr M, Schemmer P, Herr I, et al. Engineered adenoviruses combine enhanced oncolysis with improved virus production by mesenchymal stromal carrier cells. *Int J Cancer*. 2015 Aug 15;137(4):978-90.
23. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell*. 2009 May 15;137(4):609-22.
24. Pant V, Lozano G. Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway. *Genes Dev*. 2014 Aug;28(16):1739-51.
25. Shaw PH. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract*. 1996 Jul;192(7):669-75.
26. Benchimol S. p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ*. 2001 Nov;8(11):1049-51.
27. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003 Dec;22(56):9030-40.
28. Llanos S, Clark PA, Rowe J, Peters G. Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol*. 2001 May;3(5):445-52.
29. Merkel CA, Medrano RF, Barauna VG, Strauss BE. Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther*. 2013 May;20(5):317-25.
30. Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer*. 2010 Nov;127(10):2239-47.
31. Lozano G, Elledge SJ. p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature*. 2000 Mar;404(6773):24-5.
32. Moore L, Venkatachalam S, Vogel H, Watt JC, Wu CL, Steinman H, et al. Cooperativity of p19ARF, Mdm2, and p53 in murine tumorigenesis. *Oncogene*. 2003 Oct;22(49):7831-7.
33. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003;424(6948):516-23.
34. Bajgelman MC, Strauss BE. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. *Virology*. 2008 Feb 5;371(1):8-13.
35. Strauss BE, Bajgelman MC, Costanzi-Strauss E. A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition. *Cancer Gene Ther*. 2005 Dec;12(12):935-46.
36. Medrano RF, Catani JP, Ribeiro AH, Tomaz SL, Merkel CA, Costanzi-Strauss E, et al. Vaccination using melanoma cells treated with p19arf and interferon beta gene transfer in a mouse model: a novel combination for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2016 Apr;65(4):371-82.
37. Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev*. 1998;12(19):2984-91.
38. Sherr CJ. Parsing Ink4a/Arf: "pure" p16-null mice. *Cell*. 2001 Sep;106(5):531-4.
39. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006 Nov;6(11):836-48.
40. 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 Feb;146(2):238-48.
41. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):36-49.
42. Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016 Mar;16(3):131-44.
43. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381-90.

44. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. 1968 Mar;6(2):230-47.
45. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp. 1988;136:42-60.
46. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991 Sep;9(5):641-50.
47. Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. Korean J Intern Med. 2013 Jul;28(4):387-402.
48. Kolluri KK, Laurent GJ, Janes SM. Mesenchymal stem cells as vectors for lung cancer therapy. Respiration. 2013;85(6):443-51.
49. Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells. Clin Exp Med. 2003 Nov;3(3):140-9.
50. Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. Stem Cell Rev. 2005;1(2):169-78.
51. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. Gene Ther. 2008 May;15(10):730-8.
52. Abdallah BM, Kassem M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. J Cell Physiol. 2009 Jan;218(1):9-12.
53. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. Nat Rev Neurosci. 2007 Aug;8(8):610-22.
54. Hong IS, Lee HY, Kang KS. Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies? Mutat Res. 2014 Oct;768:98-106.
55. Hunger A, Medrano RFV, Zanatta DB, Valle PRD, Merkel CA, Salles TdA, et al. Reestablishment of p53/Arf and interferon- β pathways mediated by a novel adenoviral vector potentiates antiviral response and immunogenic cell death. Cell Death Discovery. 2017;In press.
56. Catani JP, Medrano RF, Hunger A, Del Valle P, Adjemian S, Zanatta DB, et al. Intratumoral Immunization by p19Arf and Interferon- β Gene Transfer in a Heterotopic Mouse Model of Lung Carcinoma. Transl Oncol. 2016 Dec;9(6):565-74.
57. Ravnani MC, Matalka MS. Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma. Clin Ther. 2012 Jul;34(7):1474-86.
58. Einhorn S, Grander D. Why do so many cancer patients fail to respond to interferon therapy? J Interferon Cytokine Res. 1996 Apr;16(4):275-81.
59. Vrancken Peeters MJ, Perkins AL, Kay MA. Method for multiple portal vein infusions in mice: quantitation of adenovirus-mediated hepatic gene transfer. Biotechniques. 1996 Feb;20(2):278-85.
60. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. Cancer Res. 2002 Jul;62(13):3603-8.
61. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. J Natl Cancer Inst. 2004 Nov;96(21):1593-603.
62. Ren C, Kumar S, Chanda D, Kallman L, Chen J, Mountz JD, et al. Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model. Gene Ther. 2008 Nov;15(21):1446-53.
63. Gao P, Ding Q, Wu Z, Jiang H, Fang Z. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma. Cancer Lett. 2010 Apr;290(2):157-66.

64. Xiang H, Nguyen CB, Kelley SK, Dybdal N, Escandón E. Tissue distribution, stability, and pharmacokinetics of Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human colon carcinoma COLO205 tumor-bearing nude mice. *Drug Metab Dispos.* 2004 Nov;32(11):1230-8.
65. Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res.* 2009 May;69(10):4134-42.
66. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012;2012:812693.
67. Kim JH, Lee HJ, Song YS. Stem cell based gene therapy in prostate cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:549136.
68. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int.* 2014;2014:951512.
69. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
70. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells.* 2006 May;24(5):1246-53.
71. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 2006 Feb;24(2):376-85.
72. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *J Tissue Eng.* 2015 Jan-Dec;6:2041731415592356.
73. Lamfers M, Idema S, van Milligen F, Schouten T, van der Valk P, Vandertop P, et al. Homing properties of adipose-derived stem cells to intracerebral glioma and the effects of adenovirus infection. *Cancer Lett.* 2009 Feb 8;274(1):78-87.
74. Wang GX, Zhan YA, Hu HL, Wang Y, Fu B. Mesenchymal stem cells modified to express interferon- β inhibit the growth of prostate cancer in a mouse model. *J Int Med Res.* 2012;40(1):317-27.

Anexo I

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/11/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **177/14** intitulado: **“Células Tronco mesenquimais como carreadoras de adenovirus no microambiente tumoral”** que utilizará **216** (24 machos e 192 fêmeas) animais da espécie camundongo, apresentado pelo Laboratório de Oncologia Experimental - ICESP

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-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 Strauss

Pesquisador (a) Executante: Ruana Calado da Costa

CEUA-FMUSP, 13 de Novembro de 2014

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