Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *in vitro* DE UM VETOR RETROVIRAL
BICISTRÔNICO CODIFICANDO ENDOSTATINA E INTERLEUCINA-2 PARA
UTILIZAÇÃO EM TERAPIA GÊNICA**

Fernanda Bernardes Calvo

São Paulo

2009

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *in vitro* DE UM VETOR RETROVIRAL
BICISTRÔNICO CODIFINCANDO ENDOSTATINA E INTERLEUCINA-2 PARA
UTILIZAÇÃO EM TERAPIA GÊNICA**

Fernanda Bernardes Calvo

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações.

Orientadora: Dra Maria Helena Bellini

São Paulo
2009

Dedico este trabalho aos meus pais, Abilio e Tereza, por todo carinho, compreensão e pelo amor incondicional. Sem vocês este sonho não teria se realizado.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo milagre da vida.

Aos meus pais, Abilio e Tereza, pela presença em todos os momentos da minha vida. Só vocês sabem o quanto me esforcei e amadureci com este projeto. Agradeço o amor, a força e dedicação que foram essenciais para a concretização deste sonho.

Ao meu irmão, Daniel, pelos ensinamentos e conselhos.

Á minha avó, Maria, pelo carinho e amor.

Á Dra Maria Helena Bellini, inicialmente por acreditar no meu potencial. Agradeço também a orientação, dedicação, os ensinamentos e conselhos, e principalmente a amizade.

Á Dra Elisabete José Vicente por ceder seu laboratório para a realização da parte molecular do trabalho e a sua aluna Cleide Barbieri por me auxiliar nos ensaios.

Ao Dr Durvanei Augusto Maria pelos ensinamentos e sugestões dadas na avaliação do seminário de área, e também pelo carinho e amizade.

Ao Dr Roger Chammas por permitir a realização do ensaio de RT-PCR em seu laboratório, e aos seus alunos Silvina e Rafael que me auxiliaram no ensaio.

Ao Dr Jean Pierre Schatzmann Peron e Dr Luiz Vicente Rizzo pelo auxílio na realização do ensaio de proliferação linfocitária.

Ao Dr Júlio Takehiro Marumo pelos conselhos e também pela amizade. E a sua secretária, Ieda, pelo carinho e ajuda.

Aos amigos de laboratório Thiago Malpighi, Adriana Miranda, Cinthia Zanini, Priscila Yazawa e Tatiana Rodrigues, por todo carinho e ajuda que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

As colegas de trabalho Flávia Rocha, Karen Cristina e Milena Cichy pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao amigo Rafael Ferreira pela paciência, ajuda e também pelos momentos de brincadeira e descontração.

Á amiga Tânia Borba pela amizade que surgiu devido aos estudos de física nuclear, reatores e radiação.

Á amiga Dra Solange Sakata pela amizade.

As amigas de trabalho Rosa Maria Chura Chambi e Janaína Baptista Alves por estarem presentes em todos os momentos, desde meu primeiro dia no IPEN. Agradeço a ajuda, o carinho e principalmente a amizade verdadeira. Amizade que tenho certeza que não se resume apenas ao ambiente de trabalho.

Á Dra Maria Teresa de Carvalho Pinto Ribela, pelas sugestões dadas na avaliação do seminário de área.

Á Dra Olga Zazuco Hirata e Dra Ligia Morganti por possibilitar a utilização de aparelhos e materiais do seu laboratório.

Ao Eduardo, técnica do departamento de química de proteínas, por toda ajuda e amizade.

Á dona “Gê”, Longino e Bete pela limpeza do laboratório e dos matérias, além do carinho e amizade.

Ao primo Beto pelos ótimos conselhos. Obrigada por dividir comigo este sonho e acompanhar o desenvolvimento deste trabalho; sem esquecer da amizade e do carinho.

Aos primos Carlos, Lúcia, André e Bruna por acompanharem de perto meu esforço e dedicação para a realização deste projeto.

Aos primos Luiz, Fátima e Vinicius por estarem presentes na minha vida.

Á amiga Danielle Renzoni pela amizade que surgiu nas disciplinas do mestrado. Agradeço os conselhos, ensinamentos e pelos momentos de descontração, alegria e amizade.

Aos amigos Walter Colallilo e Lelis Colallilo por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida profissional e pessoal.

Á Maria Lúcia Carmargo D’Ávilla por todas as orações, conselhos, ensinamentos e pela sua presença iluminada na minha vida. Agradeço também a sua filha Noemi e seu esposo Sérgio pela amizade e carinho.

Á amiga Irene pelas vibrações, energia e pensamentos positivos que me ajudaram nos momentos em que mais precisei.

Á amiga Anne Tramontin pelo carinho e amizade.

Á Dra Nanci do Nascimento, gerente do Centro de Biotecnologia do IPEN que disponibilizou o espaço físico para a realização deste projeto.

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de mestrado, e a FAPESP pelo financiamento do projeto.

“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos ficamos surpresos com nossa própria capacidade.”

Paulo Coelho

Construção e caracterização *in vitro* de um vetor retroviral bicistrônico
codificando endostatina e interleucina-2 para utilização em terapia gênica

Fernanda Bernardes Calvo

RESUMO

A terapia gênica tem sido empregada em estudos pré-clínicos e clínicos, com o intuito de amenizar ou curar uma doença. Vetores retrovirais são uma ferramenta de transferência gênica largamente utilizada. Vetores bicistrônicos são uma alternativa interessante para o tratamento de doenças complexas. Na construção de um vetor bicistrônico pode-se empregar várias estratégias dentre elas a utilização da sequência IRES. A endostatina, fragmento do colágeno XVIII, tem sido muito utilizada na terapia anti-angiogênica devido sua ação inibitória no crescimento de células endoteliais. A imunoterapia tem sido utilizada como tratamento coadjuvante de tumores. Dentre as citocinas utilizadas, a interleucina-2 promovendo a proliferação de linfócitos T, tem sido utilizada em diversos estudos pré-clínicos e clínicos. O objetivo deste projeto foi construir e caracterizar *in vitro* um vetor retroviral bicistrônico codificando endostatina e interleucina-2 utilizando a sequência IRES. A construção do vetor foi realizada em três etapas, sendo comprovada a construção final por análise de restrição e sequenciamento. Células de empacotamento foram transfectadas com o vetor, e posteriormente realizada a transdução na célula alvo. A endostatina e a interleucina-2 foram determinadas por Dot blot, seguido de análise da expressão por RT-PCR e ensaio de atividade. O vetor construído apresentou altos níveis de titulação viral, variando de 4.20×10^5 a 1.53×10^6 UFC/mL. A determinação da endostatina e da interleucina-2 variaram entre 1.08 a $2.08 \mu\text{g}/10^6 \text{cels.24h}$ e 0.66 a $0.89 \mu\text{g}/10^6 \text{cels.24h}$, respectivamente. A expressão da endostatina no clone NIH3T3-pLend-IRES-IL2SN foi 2 vezes superior á apresentada pelo clone NIH3T3-pLend-IRES-IL2SN. A endostatina produzida promoveu uma inibição da proliferação de 40% das células endoteliais; e a interleucina-2 promoveu uma proliferação de 10.6% de linfócitos CD4 e 8.9% de CD8. Desta forma, a construção obtida neste trabalho representa uma excelente ferramenta para estudos da biologia celular do câncer e novas estratégias terapêuticas.

Construction and characterization *in vitro* of a bicistronic retroviral vector
coding endostatin and interleukin-2 for use in gene therapy

Fernanda Bernardes Calvo

ABSTRACT

Gene therapy has been used in preclinical studies and clinical trials in order to alleviate or cure a disease. Retroviral vectors are a tool for gene transfer is widely used. Bicistronic vectors are an attractive alternative for treatment of complex diseases. A variety of options exists to simultaneously express two genes in genetically modified cells. The most common approach relies on bicistronic vectors in which the genes are linked to each other by an internal ribosome entry site allowing co-translational expression of both cistrons. Endostatin, the C-terminal fragment of collagen XVIII, is a potent angiogenesis inhibitor. At present, ES has been widely used in anti-angiogenic in a variety of experimental tumor models, and clinical trials to test it as an anti-tumor agent are already under way. Immunotherapy has been used as adjuvant treatment for tumors and has been used in several preclinical studies and clinical trials. The objective of this project was to construct and characterize "in vitro" an IRES-based bicistronic retroviral vector encoding endostatin and interleukin-2. The construction of the vector was performed in three stages, the final construction was analyzed by restriction analysis and sequencing. Packaging cells were prepared. The endostatin and interleukin-2 levels were determined by Dot blot. Monocistronic and bicistronic mRNA expression were analyzed by real time RT-PCR. Bicistronic vector showed high levels of virus titer, ranging from 4.20×10^5 to 1.53×10^6 UFC/mL. Secreted levels of endostatin and interleukin-2 ranged from 1.08 to $2.08 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells.24h}$ and $0.66 - 0.89 \mu\text{g}/10^6 \text{ cells.24h}$, respectively. The mRNA expression of ES in the NIH3T3 clone pLend-IRES-IL2SN was 2 times higher than the level presented by the NIH3T3 clone pLendSN. The endostatin promoted inhibition (40%) of endothelial cell proliferation. Interleukin-2 promoted a proliferation of 10.6% lymphocytes CD4 and 8.9% of CD8. We conclude that the IRES bicistronic vector provides a powerful tool for studies of cell biology of cancer and new therapeutic strategies.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	12
Lista de Figuras	13
Lista de Abreviaturas	15
I – INTRODUÇÃO	
1.1. Terapia Gênica	18
1.1.1. Vetores bicistrônicos	20
1.2. Terapia Anti-angiogênica	21
1.2.1. Endostatina	22
1.3. Imunoterapia	24
1.3.1. Interleucina-2	24
1.4. Possíveis aplicações	26
II - OBJETIVOS	
2.1. Objetivos Gerais	28
2.2. Objetivos Específicos	28
III – MATERIAIS	
3.1. Principais equipamentos.....	29
3.2. Principais reagentes	29
3.3. Cepa de <i>Escherichia coli</i>	30
3.4. Plasmídeos	31
3.5. Enzimas de Restrição	31
3.6. Padrões de peso molecular	31
3.7. Linhagens celulares	31
3.7.1. Fibroblastos GP+E86	32
3.7.2. Fibroblastos GP+env+AM12	32
3.7.3. Fibroblastos NIH/3T3	32
3.7.4. Célula endotelial de cordão umbilical humano (HUVEC)..	32
3.8. Animais	33
3.8.1. Camundongos DO11.10	33
IV - METODOS	
4.1. Construção do Vetor Bicistrônico	34
4.1.1. Transformação em bactérica competente DH5α	34

4.1.2. Extração do DNA	34
4.1.3. Construção do vetor pLend-IRES-SN.....	35
4.1.4. Construção do vetor pSecTag-mIL2	35
4.1.5. Inserção de um sítio de restrição ao vetor pSecTag-mIL2	36
4.1.6. Construção do vetor pLend-IRES-IL2SN	36
4.1.7. Sequenciamento do vetor pLend-IRES-IL2SN	37
4.2. Obtenção das células produtoras	37
4.2.1. Transfecção transiente em células GP+E86	37
4.2.2. Transdução permanente em células GP+env+AM12	38
4.2.3. Titulação Viral	38
4.2.4. Transdução na célula alvo	39
4.3. Caracterização do vetor bicistrônico	39
4.3.1. Determinação da ES e IL-2	39
4.3.2. Western blot para ES e IL-2	40
4.3. Extração de RNAm dos fibroblastos transduzidos com o vetor bicistrônico	40
4.3.4. Obtenção do cDNA	41
4.3.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real	41
4.3.6. Ensaio da atividade da ES em células endoteliais.....	42
4.3.7. Ensaio da atividade da IL-2 na proliferação dos linfócitos	42
 V – RESULTADOS	
5.1. Construção do vetor pLend-IRES-IL2SN	44
5.1.1. Construção do vetor pLend-IRES-SN.....	45
5.1.2. Construção do vetor pSecTag-mIL2	46
5.1.3. Inserção de um sítio de restrição do vetor pSecTag-mIL2	47
5.1.4. Construção do vetor pLend-IRES-IL2SN	47
5.1.5. Sequenciamento do vetor pLend-IRES-IL2SN	50
5.2. Obtenção das células produtoras	51
5.2.1. Transfecção transiente em células GP+E86	51
5.2.2. Transdução permanente em células GP+env+AM12	52
5.2.3. Titulação Viral	53
5.2.4. Transdução em célula alvo	54
5.3. Caracterização do vetor bicistrônico	55

5.3.1. Determinação da ES e IL-2	55
5.3.2. Western blot para ES e IL-2	57
5.3.3. Análise qualitativa do RNA extraído dos clones NIH/3T3 – pLXSN e NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN	57
5.3.4. Avaliação da expressão da ES em NIH/3T3 – pLendSN e NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2N.....	58
5.3.5. Ensaio da atividade da ES em células endoteliais	59
5.3.6. Ensaio da atividade da IL-2 na proliferação dos linfócitos.	60
VI – DISCUSSÃO	62
VII – CONCLUSÕES	66
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Titulação viral da transdução do vetor bicistrônico em células NIH/3T3	54
Tabela 2 – Concentrações de ES e IL-2 secretadas pelos clones NIH/3T3 pLend-IRES-IL2SN	56
Tabela 3 – Relação da expressão da ES em NIH/3T3-pLendSN e NIH/3T3-pLend-IRES-IL2SN.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo do ciclo dos vetores retrovirais usados em terapia gênica	19
Figura 2 – Representação do uso da sequência IRES na construção de vetores bicistrônicos	20
Figura 3 – Esquema da estrutura do colágeno XVIII	22
Figura 4 – Estrutura tridimensional da interleucina-2	25
Figura 5 – Mapa da construção do vetor pLend-IRES-IL2SN.....	44
Figura 6 – Análise de restrição de 10 clones do vetor pLend-IRES-SN em gel agarose 0.8%	45
Figura 7 – Análise de restrição de 10 clones do vetor pSecTag-mIL2 em gel agarose 0.8%	46
Figura 8 – Análise do produto da reação de PCR em gel agarose 0.8% ...	47
Figura 9 – Análise de restrição de 17 clones do vetor pLend-IRES-IL2SN em gel agarose 0.8%.....	48
Figura 10 – Esquema do vetor pLend-IRES-IL2SN	49
Figura 11 – Análise de restrição do vetor pLend-IRES-IL2SN em gel agarose 0.8%	49
Figura 12 – Sequenciamento da extremidade 5' da construção bicistrônica	50
Figura 13 – Sequenciamento da extremidade 3' da construção bicistrônica	51
Figura 14 – Células GP+E86 após transfecção	51
Figura 15 – Células GP+env+AM12 após 10 dias de transdução	52
Figura 16 – Células coradas com Rodamina B 2%	53
Figura 17 – Curvas padrão para determinação da ES e IL-2	55
Figura 18 – <i>Dot blot</i> com o meio de cultura de 24 horas de fibroblastos transduzidos com o vetor bicistrônico	56
Figura 19 – Análise por <i>Western Blot</i> do meio de cultura dos clones NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN 1, 3 e 6	57
Figura 20 – Avaliação da integridade do RNA em gel de agarose 0.8%....	58

Figura 21 – Gráfico demonstrativo da relação da expressão do RNAm da endostatina e β -actina obtida por RT-PCR	59
Figura 22 – Inibição de crescimento de células endoteliais pela endostatina liberada pelo clone 3	60
Figura 23 – Proliferação linfocitária de CD4 e CD8 pela interleucina-2 produzida pelo clone 3.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – Coleção Americana de Tipos de Cultura
bFGF – fator básico de crescimento de fibroblastos
C-terminal – domínio carboxi-terminal
CaCl₂ – cloreto de cálcio
CD – grupamento de diferenciação
cDNA – DNA complementar
CFSE – carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester
DEPEC – dietilpirocarbonato
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA – ácido deoxiribonucléico
dNTP – deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
EMCV – vírus da encefalomiocardite
EOMA – hemangioendotelioma
ES – endostatina
FACS – Fluorescence activated cell sorter
FDA – *Food and Drug administration*
HCl – ácido clorídrico
HCV – vírus da hepatite C
HSV-tk – Vírus Herpes simplex – timidina kinase
HUVEC – célula endotelial humana de cordão umbilical
IFN-γ – interferon γ
IL-2 – interleucina-2
IRES – sítio de acesso interno ao ribossomo
JAK – via Janus Kinase
LB – meio de cultura Lubia Bertani
MCP-1 – proteína estimuladora de monócitos do tipo 1
MoMLV – vírus da leucemia murina Moloney
N-terminal – domínio amino-terminal
NC – domínio não colágeno

NaCl – cloreto de sódio
NK – célula natural killer
Na₂HPO₄ – fosfato de sódio
NaH₂PO₄ – fosfato de sódio monobásico
NaOH – hidróxido de sódio
pb – par de base
PBS – tampão fosfato salina
PCR – reação em cadeia da polimerase
pLendSN – vetor retroviral pLXSN contendo o cDNA da endostatina
pLend-IRES-IL2SN – vetor retroviral pLXSN contendo o cDNA da endostatina e da interleucina-2
PMS/MTS – fenazina metossulfato/ tetrazolium
pSecTag-mIL2 – vetor pSecTag-2A contendo o cDNA da interleucina-2
RNA – ácido ribonucléico
RNA_m – RNA mensageiro
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS – dodecil sulfato de sódio
SFB – soro fetal bovino
SPF – livre de patógeno específico
SS-IL2 – sequência sinalizadora com o cDNA da interleucina-2
TBS – tampão tris salina
TCGF – fator de crescimento de linfócitos
TNF- α – fator de necrose tumoral tipo α
VEGF – fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR – receptor do fator de crescimento vascular endotelial

μ L – microlitro
 μ F – micro
 Ω – ohms
Kv – símbolo de tensão elétrica
rpm – rotações por minuto
ng – nanogramas

UFC/mL – unidade formadora de colônia por mililitro

μg/mL – microgramas por mililitro

M – molar

mg/mL – miligramas por mililitro

mL – mililitro

I - INTRODUÇÃO

1.1 Terapia Gênica

Terapia gênica pode ser definida como a introdução de material genético nas células ou tecido, com a finalidade de amenizar ou curar uma doença. A terapia gênica foi utilizada para tratamento de doenças genéticas monogênicas (Goverghana, 2006). Com o passar dos anos, a aplicação da técnica de transferência gênica cresceu sendo hoje utilizada para o tratamento de doenças complexas como o câncer, com inúmeros estudos pré-clínicos e clínicos (Dullaers, 2006; Rodrigues, 2007). Experimentalmente, a terapia gênica tem sido aplicada em várias abordagens terapêuticas como: silenciamento gênico, imunoterapia, expressão de proteínas anti-angiogênicas e genes suicidas (Barzon, 2002; Yao, 2004; Beissel, 2007; Coutinho, 2007).

Existem dois métodos de transferência gênica: o método *ex vivo* – no qual as células do paciente são removidas, modificadas *in vitro* e reimplantadas no paciente; e o método *in vivo* – que consiste na introdução do gene de interesse diretamente no paciente (Bleiziffer, 2007).

A transferência ou introdução do material genético pode ser realizada por vetores não-virais e virais. Os vetores não-virais incluem desde a inoculação direta do DNA até a utilização do DNA complexado á lipídeos catiônicos que permitem a passagem do material genético pela membrana celular (Seth, 2005). Tais métodos, não apresentam alta eficiência na transferência gênica possibilitando apenas uma expressão gênica transitória, uma vez que raramente ocorre a integração do transgene ao DNA cromossômico (Romano, 2006).

Os vetores virais são os mais utilizados em protocolos de terapia gênica devido à alta eficiência de transdução. Dentre eles destacam-se os retrovírus, pela capacidade de integração ao genoma do hospedeiro garantindo uma expressão estável do transgene (Hahm, 2004 e Lira, 2008), e por apresentarem baixa imunogenicidade comparada com os demais vetores virais (Altaner, 2008).

Vetores retrovirais são defectivos, ou seja, não possuem capacidade de infecção e produção de partículas. Para que isto ocorra, estes vetores devem ser introduzidos em células de empacotamento viral.

O vetor retroviral derivado do vírus da leucemia murina Moloney (Mo-MLV) contém em seu genoma a sequência sinal de empacotamento (ψ), necessária para o encapsidamento viral (Robbins, 1998; Hahm, 2004). As células de empacotamento viral possuem dois plasmídeos, um contendo os genes *gag* e *pol* (gene *gag* responsável pela codificação das proteínas do capsídeo viral; gene *pol* responsável pela codificação da transcriptase reversa) e o outro, contendo o gene *env* (responsável pela codificação das proteínas do envelope) (Dalba, 2007). As partículas produzidas por células de empacotamento reconhecem receptores na membrana da célula-alvo, liberando o RNA e a transcriptase reversa, converte o RNA em DNA, que será integrado ao genoma da célula-alvo, para a produção da proteína de interesse (Figura 1) (Verma, 1997).

Figura 1: Esquema representativo do ciclo dos vetores retrovirais usados em terapia gênica. Modificado de Verma, 1997.

Vetores retrovirais monocistrônicos, ou seja, que transferem apenas um gene para células alvo (Chinnasamy, 2006) foram utilizados em nosso grupo

na estratégia de silenciamento gênico e na terapia anti-angiogênica com resultados promissores (Beissel, 2007; Coutinho, 2007).

1.1.1 Vetores Bicistrônicos

A co-expressão de genes pode aumentar a eficiência e versatilidade das aplicações da terapia gênica. Existem várias estratégias que são empregadas em vetores virais para permitir a expressão de múltiplos genes incluindo promotores internos, fusão de proteínas, fatores de clivagem, e sítio de acesso interno do ribossomo (IRES) (Arfi, 2005 e Martin, 2006).

A sequência IRES foi inicialmente descoberta em RNA de picornavírus, sendo identificado posteriormente em vírus da encefalomiocardite (EMCV), vírus da hepatite C (HCV) e RNA de células de eucarioto (Balvay, 2009). A habilidade do IRES de recrutar ribossomos, especificamente a subunidade 40S, por um mecanismo interno permite a transcrição de dois genes em um único RNA mensageiro, com a tradução das proteínas separadamente (Figura 2) (Lospitão, 2008; Baird, 2006; e Wang, 2005).

Figura 2: Representação do uso da sequência IRES na construção de vetores bicistrônicos. Modificado de Wang, 2005

Zhang *et al* demonstraram com ensaios *in vivo*, a co-expressão de dois genes, timidina kinase (gene suicida HSV-tk) e TNF- α , utilizando a sequência IRES. A estratégia foi eficiente para o tratamento de carcinoma gástrico,

promovendo a morte das células tumorais pelo gene timidina kinase e o TNF- α ativou e proliferou os linfócitos, aumentando a resposta imune anti-tumoral (Zhang, 2004). O mesmo foi comprovado por Tsuchiyama *et al*, com a co-expressão do gene da timidina kinase e MCP-1 (proteína estimuladora de monócitos) utilizando a sequência IRES, resultando na redução do carcinoma hepatocelular e prolongamento da resposta anti-tumoral via células natural-killer (Tsuchiyama, 2006).

Em eucariotos, a transcrição é dependente da estrutura CAP, sítio de ligação para o ribossomo. No caso das construções bicistrônicas com a sequência IRES, o primeiro cistron tem a transcrição CAP-dependente, e o segundo cistron tem a transcrição IRES-dependente. A transcrição ocorre em um único RNA mensageiro, mas as proteínas não apresentam o mesmo nível de expressão gênica. Geralmente, a transcrição IRES-dependente apresenta níveis menores do que a transcrição CAP-dependente (Pfutzner, 2008).

1.2 Terapia Anti-angiogênica

Angiogênese, formação de novos vasos a partir de vasos pré-existent, é essencial durante o desenvolvimento embrionário e processos fisiológicos, como durante o ciclo menstrual. A formação de novos vasos é um complexo processo de múltiplos estágios controlado por diversos fatores, como VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e bFGF (fator de crescimento de fibroblasto). Nos tumores, o processo angiogênico permite o crescimento tumoral bem como sua metastização (Xu, 2008). Segundo Hanahan e Folkman, tumores sólidos de até 2mm³ podem permanecer anos com essas dimensões devido ao equilíbrio entre fatores angiogênicos e anti-angiogênicos. A quebra do equilíbrio entre esses fatores e consequentemente o aumento da concentração de proteínas angiogênicas, possibilita o crescimento do tumor primário e a formação de metástases (Hanahan, 1996).

Inibidores da angiogênese tem se destacado na terapia anti-tumoral, principalmente inibidores endógenos como angiostatina e endostatina, que já

estão sendo empregadas em diversos estudos pré-clínicos e clínicos (Sauter, 2000).

1.2.1 Endostatina

Endostatina (ES) é um fragmento do colágeno XVIII. O colágeno XVIII é um proteoglicano heparan sulfato, pertencente à família dos colágenos caracterizados por apresentarem domínio triplo-helicoidal e domínios não-colágenos (Dixelius, 2003). Sua estrutura é formada por dez domínios colágenos interrompidos por onze domínios não colágenos (NC), além das regiões amino-terminal (N-terminal) e carboxi-terminal (C-terminal) (Figura 3-A). A região C-terminal é formada pelo domínio trimerização, o domínio dobradiça, e o domínio endostatina (Figura 3-B) (Ortega, 2002).

Figura 3: Esquema da estrutura do colágeno XVIII. **A** – Colágeno XVIII: Domínio triplo-helicoidal formado por dez domínios colágenos e onze domínios não-colágenos, e as três cadeias de heparan-sulfato; Domínio N-terminal; e o Domínio C-terminal. **B** – Domínio C-terminal: domínio de trimerização, domínio dobradiça e domínio endostatina. (Modificado de: Nature Reviews – Molecular Cell Biology)

O colágeno XVIII está presente na membrana basal de diversos órgãos, podendo ser clivado no domínio dobradiça por diversas proteases, como metaloproteinases do tipo 3, 7, 9, 13 e 20, catepsina L e elastase, liberando a ES (Felbor, 2000 e Heljasvaara, 2005).

A ES, proteína de 20-22KDa, é caracterizada pela sua forma globular compacta com sua superfície rica em arginina, que ao ligar-se com a heparina permite sua atividade anti-angiogenica (Olsson, 2004). A estrutura da molécula apresenta duas pontes dissulfídicas que conferem sua estabilidade (John, 2001).

Em 1997, O'Reilly isolou e purificou a ES do meio de cultura da linhagem celular murina hemangioendoctelioma (EOMA), sendo o primeiro fragmento endógeno de uma proteína de matriz (colágeno XVIII) caracterizado com propriedades anti-angiogênicas. A ES tem sua ação em células endoteliais, inibindo a proliferação e a migração celular (O'Reilly, 1997). A ES não possui nenhum receptor específico descrito na literatura, entretanto diversos estudos comprovaram sua ligação a proteínas de membrana como as integrinas $\alpha 5 \beta 1$ e $\alpha \nu \beta 3$, proteoglicanos heparan sulfato, e receptor de fator de crescimento endotélio vascular (VEGFR) (Faye, 2009). Recentemente, Shi *et al* reportou a nucleolina como sendo o receptor da ES, além da alta afinidade de ligação da ES a nucleolina, é pela nucleolina que a ES é internalizada, promovendo sua ação em células endoteliais (Shi, 2007).

Desde a sua descoberta, a ES tem sido objeto de diversos estudos *in vitro*, em modelos animais e protocolos clínicos (Boehle, 2001; Kisker, 2001, Sorensen, 2002), uma vez que a angiogênese é necessária para a sustentabilidade do crescimento tumoral e a sua metastatização (Zhuang, 2009). Além do câncer, a ES tem sido usada em modelos de inibição da neovascularização (Mori, 2001) e tratamento de artrite reumatóide (Matsumo, 2002; Yin, 2002).

Sauter *et al* demonstraram que a ES recombinante levou a redução de 78% do carcinoma pulmonar de Lewis em relação ao controle, além de prevenir completamente a metástase pulmonar (Sauter, 2000). Recentemente, nosso grupo demonstrou a redução de carcinoma renal em camundongos após a administração de fibroblastos transduzidos com vetor retroviral monocistônico codificando o gene da endostatina (Coutinho, 2007).

Em 2005, A ES teve seu uso aprovado pelo *State Food and Drug Administration* (SFDA) da China para tratamento de câncer pulmonar (Sun, Y 2005). Diversos protocolos clínicos de fase I têm utilizado a ES recombinante para o tratamento de diversos tumores metastáticos, como melanoma, sarcoma, coloretal, mama e renal. Nesses estudos, a administração diária da ES foi de 15-600mg/m²/dia mediante pequenas infusões intravenosas, sem sinais de toxicidade, com uma farmacocinética linear, e redução significativa da angiogênese tumoral (Eder, 2002; Herbst, 2002; Thomas, 2003).

1.3 Imunoterapia

Imunoterapia consiste no uso de modificadores da resposta imune, como: anticorpos monoclonais, citocinas, imunoterapia celular, e vacinas para o tratamento do câncer (Dougan, 2008). A imunoterapia pode ser classificada em ativa e passiva, de acordo com as substâncias utilizadas e seus mecanismos de ação. Na forma ativa, substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica (inespecífica) e as vacinas de células tumorais (específica) são administradas com a finalidade de intensificar a resistência ao crescimento tumoral. Já a forma passiva, anticorpos antitumorais ou células mononucleares exógenas são administrados objetivando proporcionar capacidade imunológica de combate a doença.

1.3.1 Interleucina-2

A interleucina-2 (IL-2) é uma importante citocina do sistema imune, descoberta em 1976 por Morgan et al, como sendo um fator de crescimento de linfócitos (TCGF – T-Cell Growth Factor) (Morgan, 1976). A IL-2 tem sua principal ação na diferenciação e proliferação de linfócitos T (Nelson, 2004), mas também atua em outras células do sistema imune, como no crescimento e diferenciação de linfócitos B (Romagnani, 1985); na atividade das células natural-killer (NK) e na liberação de fatores como fator de necrose tumoral (TNF) e interferon γ (IFN- γ) pela célula NK (Sutlu, 2009); e também atua na diferenciação de células dendríticas (Civallero, 2000; Narajo-Gomez, 2007).

IL-2 é uma proteína globular glicosilada com aproximadamente 15KDa de peso molecular. Inicialmente é secretada na forma pró-ativa com 153 aminoácidos, após a clivagem de 20 aminoácidos e sua glicosilação, a IL-2 é secretada na forma ativa pela via vesicular (Gaffen, 2004). A IL-2 é formada por quatro α -hélices que são indispensáveis para a execução de sua função (Figura 4). Seu receptor é formado por três subunidades: α (CD25), β (CD122) e γ (CD122), que resultam em alta afinidade do receptor pela IL-2 (Olejnik, 2008).

Figura 4: Estrutura tridimensional da IL-2.

Em células T, a IL-2 liga-se ao seu receptor ativando o Janus kinase (JAK), tradutor de sinal e ativador da via de transcrição (STAT), bem como a ativação de proteínas quinases e a sinalização da proteína fosfatidilinositol-3 quinase, resultando na transcrição de citocinas pró-inflamatórias de sobrevivência e de genes do ciclo celular. Por essas vias, a IL-2 regula a expressão de CD25 e da cadeia β do seu receptor, modula genes envolvidos na regulação do ciclo celular, e promove a proliferação e diferenciação das células-T em células efetoras e de memória (Hoyer, 2009).

Clonada em 1983 (Taniguchi, 1983), a IL-2 recombinante tem seu uso aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e na Europa para tratamento de carcinoma renal (Margolin, 2008) e melanoma (Kirkwood, 2008). O uso da IL-2 requer cuidados quando administrada intravenosa, pois em altas doses causa efeitos tóxicos, como retenção de líquidos,

hipotensão, problemas cardíacos devido a redução do volume plasmático (Kamikawa, 2008).

Em estudos de fase II, a administração da IL-2 tem mostrado efeitos anti-tumoral em pacientes com melanoma metastático avançado, com uma resposta de aproximadamente 16% (Atkins, 2000). Trudel *et al* demonstraram um inibição de 17-69% do tumor de próstata quando tratados *in situ* com vetor viral contendo o gene da IL-2, com um efeito citotóxico mínimo quando comparado com outros métodos de administração (Trudel, 2003).

1.4 Possíveis aplicações

A expressão simultânea de uma proteína com ação anti-angiogênica, endostatina, e uma proteína com ação imunológica, interleucina-2, representa uma ferramenta de alta aplicabilidade na terapia gênica de tumores sólidos responsivos a imunoterapia, como por exemplo carcinoma renal, melanoma metastático e carcinoma hepatocelular.

Carcinoma renal metastático é um dos tumores resistentes a quimioterapia (Vogelzang, 1998), característica que gerou novos alvos terapêuticos visando uma melhor estimativa de vida e regressão da doença (Drucker, 2005). A ES, experimentalmente, tem sido muito eficiente para o tratamento deste tumor, reduzindo 73-91% a massa tumoral e inibindo a metastase pulmonar (Yoon, 1999; Sauter, 2000). A IL-2 é aprovada pelo FDA para o carcinoma renal, apresentando uma resposta de 10-23%, sendo que sua administração subcutânea apresenta uma menor toxicidade em relação a administração intravenosa, com o mesmo efeito terapêutico (Guida, 2007; Rini, 2009).

O melanoma metastático é um tumor altamente vascularizado e quimio-resistente (Yang, 2009) favorecendo o uso da terapia anti-angiogênica. Há evidências que a terapia anti-angiogênica quando conjugada com a imunoterapia promova efeitos sinérgicos, potencializando o efeito anti-angiogênico neste tumor. A ES já foi utilizada para o tratamento do melanoma metastático em um estudo clínico, com resultados promissores (Moschos, 2007). A IL-2, aprovada pelo FDA,

tem seu uso limitado devido a alta toxicidade quando administrada intra-venosa (Kamikawa, 2008).

Carcinoma Hepatocelular, outro tumor altamente vascularizado, também tem como alvo terapêutico a angiogênese (Greten, 2008). Em modelos animais de carcinoma hepatocelular foi demonstrado uma redução significativa da massa tumoral após administração da ES recombinante (Li, 2005; Liu, 2007). A imunoterapia com IL-2 tem sido utilizada juntamente com a quimioterapia, promovendo uma diminuição da massa tumoral (Butterfield, 2007).

Diversos são os estudos que utilizam a ES ou a IL-2 para o tratamento tumoral, portanto a construção de um vetor codificando essas duas proteínas representaria uma excelente ferramenta para estudos de biologia celular do câncer e novas estratégias terapêuticas.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Construir um vetor retroviral bicistrônico com o cDNA da ES e da IL-2;
- Analisar a eficiência *in vitro* do vetor construído.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir o vetor Lend-IRES-SN;
- Construir o vetor pSecTag-mIL2;
- Construir o vetor Lend-IRES-IL2SN;
- Verificar a eficiência de transfeção do vetor bicistrônico em células de empacotamento viral;
- Avaliar a produção das proteínas CAP-dependente e IRES-dependente no vetor bicistrônico;
- Avaliar a expressão do RNAm da ES no vetor bicistrônico e comparar com a expressão do vetor monocistrônico;
- Comprovar a atividade biológica *in vitro* da ES e IL-2.

III. MATERIAIS

3.1 Principais Equipamentos

- Agitador magnetic 78HW-1, Biomixer (EUA)
- Agitador, modelo TS-2000A VDRL, Biomixer (EUA)
- Aparattus de *Dot Blot*, BioRad (EUA)
- Aparattus de eletroforese horizontal Minis-300, Major Science (China)
- Aparattus de eletroforese vertical, BioRad (EUA)
- Aparelho Milli-Q-plus, purificador de água, Millipore (EUA)
- Autoclave vertical Modelo 415, Fanem (Brasil)
- Balança analítica, modelo AW 220, Shimadzu (Japão)
- Banho-maria, Major Science (China)
- Centrifuga refrigerada automática, modelo 5810R, Eppendorf (Alemanha)
- Citometro de fluxo FACScalibur, Bencton-Dickinson (EUA)
- Eletroporador, modelo II, Invitrogen (EUA)
- Equipamento de biosegurança Fluxo Bio Seg 12, Veco (Brasil)
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421, Tecnal (Brasil)
- Incubadora de CO2 Forma Series II Hepa Class 100, Thermo Scientific (EUA)
- Leitor de E.L.I.S.A. Spectra Max 190, Molecular Devices (EUA)
- Microscópio invertido, modelo TMS, Nikon (Japão)
- Sistema de fotodocumentação digital, UVP (EUA)
- Termociclador CG1-86, Corbett Research (Austrália)

3.2 Principais Reagentes

- Acetato de sódio, Sigma (EUA)
- Ácido acético glacial P.A., LabSynth (Brasil)
- Ácido bórico, Carlo Erba (Brasil)
- Ácido clorídrico, LabSynth (Brasil)
- Acrilamida, BioRad (EUA)
- Agarose, Invitrogen (EUA)

- Alcool etílico absoluto P.A., LabSynth (Brasil)
- Alcool isoamílico, LabSynth (Brasil)
- Ampicilina sódica, Bayer (Brasil)
- Bicarbonato de sódio, LabSynth (Brasil)
- Brometo de etídeo, Pharmacia Biotech (EUA)
- Cloreto de cálcio, Sigma (EUA)
- Cloreto de magnésio, Promega (EUA)
- Cloreto de sódio, LabSynth (Brasil)
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Merck (Brasil)
- EDTA, BioRad (EUA)
- Geneticina, Invitrogen (EUA)
- Glicina, BioRad (EUA)
- Glutamina, Gibco (EUA)
- Hidróxido de sódio, Sigma (EUA)
- Hepes, Sigma (EUA)
- Kanamicina, Sigma (EUA)
- L-glutamina, LabSynth (Brasil)
- Meio LB, Acumedia (EUA)
- Meio LB-ágar, Acumedia (EUA)
- Penicilina-Sptretomicina, Gibco (EUA)
- Polibreno, Sigma (EUA)
- Rodamina B, Sigma (EUA)
- SDS, BioRad (EUA)
- Tripsina, Gibco (EUA)
- Tris, BioRad (EUA)

3.3 Cepas de *Escherichia coli*

A cepa da bactéria *Escherichia coli* utilizada foi a DH5 α (Invitrogen®), que é específica para amplificação de plasmídeos de clonagem.

3.4 Plasmídeos

- pLendSN – construído em nosso laboratório em um projeto anterior (Coutinho, 2007).

- pIRES – ClonTech®

- pSecTag-2C – gentilmente cedido pela Dra Ana Lúcia T. O. do Nascimento, do Instituto Butantan.

- pUMVC3-mIL2 – Aldevron®

3.5 Enzimas de Restrição

As enzimas utilizadas foram adquiridas da BioLabs, com exceção da *BamH I* e *CIAP* que foram adquiridas da Fermentas®. Os dNTPs foram adquiridos pela Thermo Scientific® e o MasterMix da Eppendorf®.

3.6 Padrões de peso molecular

- Marcador Gene Rule 1Kb DNA Ladder Plus, Fermentas®.

- Marcador Lambda Hind III 100ng/μL, Qbiogene®.

- Marcador High-range Rainbow RPN746E, GE Healthcare®.

3.7 Linhagens celulares

As linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, EUA) suplementado com 100U/mL de penicilina (Gibco, EUA), 50mg/mL de streptomicina (Gibco, EUA) e 10% de SFB (Soro fetal bovino, Gibco, EUA). Com exceção da linhagem HUVEC, que foi cultivada em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco, EUA) também suplementado com 100U/mL de penicilina, 50mg/mL de streptomicina e 10% SFB.

3.7.1 *Fibroblastos GP+E86*

Esta linhagem celular foi gentilmente cedida pelo Dr Arthur Bank do Department of Genetics & Development Columbia University (USA). As células de empacotamento GP+E86 são fibroblastos de camundongo NIH/3T3 que foram co-transfectadas com os plasmídeos pgag-polgt (contendo os genes *gag*, *pol*) e penv (contendo o gene *env*). As partículas virais produzidas por estas células possuem proteínas em seu capsídeo que reconhecem receptores de células murinas. Esse processo originou uma linhagem de empacotamento viral de alta eficiência e segurança (Markovits, 1988 A).

3.7.2 *Fibroblastos GP+env+AM12*

As células de empacotamento GP+env+AM12, também cedidas pela Columbia University, são fibroblastos de camundongo NIH/3T3 que foram co-transfectados com o plasmídeo contendo os genes *gag* e *pol* (pgag-polgpt) e o plasmídeo contendo o gene *env* (penv). O gene *env* expressa proteínas no capsídeo viral que reconhecem receptores de membrana celular de células humanas e murinas. Esse processo originou uma linhagem de empacotamento viral anfotrófica, de alta eficiência e segurança (Markovits, 1988 B).

3.7.3 *Fibroblastos NIH/3T3*

São células de camundongos NIH/3T3, sendo utilizadas no ensaio de titulação viral.

3.7.4 *Célula endotelial de cordão umbilical humano – HUVEC*

Essa linhagem celular foi gentilmente cedida pela Dra Dulcineia Saes Parra Abdalla do departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil).

HUVEC é uma linhagem de células endoteliais imortalizadas derivada da veia umbilical humana, comercializada pela ATCC (American Type Culture

Collection). É muito utilizada em estudos da função da célula endotelial, bem como em ensaios de inibição de célula endotelial (Gifford, 2004).

3.8 Animais

Este trabalho foi aprovado pelo CEP N° 1290/07.

3.8.1 Camundongos DO11.10

Para o ensaio de proliferação linfocitária, utilizamos camundongos Balb/c DO11.10 transgênicos, com receptor TCR para ovalbumina (Murphy, 1990). Os animais com idade entre 6-8 semanas, cedidos pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sendo mantidos sobre condições SPF (livre de patógeno específico).

IV. MÉTODOS

4.1 Construção do Vetor Bicistrônico

4.1.1 Transformação em bactérias competentes DH5α

As bactérias competentes DH5α foram preparadas com o método de Hanahan's (Sambrook, 2001) e transformadas com o plasmídeo de interesse por eletroporação, nas seguintes condições: 25μF, 200Ω e 2,5Kv. Foi utilizado 10ng do vetor fechado ou 2μL da mistura de ligação, juntamente com 40μL da bactéria competente. Após o choque, foi adicionado à mistura 1mL de meio SOC (Sambrook, 2001), mantido a 37°C sob agitação por 1 hora. Após este período, foram aplicados 100μL e 200μL da cultura em placa de LB-ágar contendo o antibiótico específico para cada vetor, as placas foram mantidas em estufa a 37°C *overnight*.

4.1.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada com 3 mL da cultura bacteriana de 16 horas pelo método da lise alcalina (Sambrook, 2001). A cultura bacteriana foi centrifugada a 5000rpm por 5 minutos para a formação do pellet bacteriano, que foi ressuspenso com 300μL da Solução I (0,01M EDTA pH 8,0 / 0,05M Tris-HCl pH 8,0); adicionamos 300μL da Solução II (0,2N NaOH / 1% SDS), permanecendo por 5 minutos a temperatura ambiente; 300μL da Solução III (3M de Acetato de Potássio / 2M de Ácido Acético) foi adicionado, permanecendo no gelo por 10 minutos. A mistura foi então centrifugada a 13000rpm, 4°C por 15 minutos; o sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 750μL de clorofórmio/álcool-isoamílico (na proporção 24:1); centrifugamos por 2 minutos a 5000rpm em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, adicionando 700μL do isopropanol, incubando por 30 minutos no gelo, e posteriormente centrifugado a 13000rpm, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi

descartado e o pellet foi ressuspendido com 30µL de água Milli-Q e RNase A (10mg/mL). A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e armazenada a -20°C.

4.1.3 Construção do vetor pLend-IRES-SN

As bactérias competentes DH5α foram transformadas com os vetores pLendSN e pIRES, e posteriormente realizamos a extração do DNA. Aproximadamente 500ng do vetor pLendSN foi linearizado com uma unidade da enzima *Xho I* a 37°C por 1 hora, posteriormente foi precipitado com isopropanol e digerido com uma unidade da enzima *BamH I* a 37°C por 1 hora. O vetor pIRES foi digerido com as mesmas enzimas do vetor pLendSN, nas mesmas condições, liberando o fragmento correspondente a sequência IRES. A digestão dos dois vetores foi verificada por gel de agarose 0,8%, e a banda correspondente a sequência IRES foi purificada através do Kit de Purificação da Qiagen®, seguindo as orientações do fabricante. A mistura de ligação foi preparada com base na molaridade do vetor e do inserto, na proporção de 1:3 (1: vetor; 3: inserto), com uma unidade da enzima T4 DNA Polimerase, permanecendo *overnight* a 16°C. Foi realizado a transformação e o plaqueamento com 50µL da reação, e em seguida a incubação *overnight* a 37°C.

4.1.4 Construção do vetor pSecTag-mIL2

Inicialmente as bactérias competentes DH5α foram transformadas com os vetores pSecTag2C e pUMVC-3mIL2 e após realizamos a extração por lise alcalina. Aproximadamente 500ng do vetor pSecTag-2C foi linearizado com uma unidade da enzima *Hind III* a 37°C por 1 hora, a mistura foi precipitada com isopropanol e posteriormente tratado com 0,2 unidades da enzima *Klenow* a 25°C por 15 minutos, a mistura foi novamente precipitada, e posteriormente digerido com uma unidade da enzima *BamH I*. O cDNA da IL-2 foi obtido com 500ng do vetor pUMVC3-mIL2 digerido com uma unidade da enzima *EcoR V* a 37°C por 1 hora, e após precipitação com isopropanol foi digerido com uma unidade da enzima *BamH I* a 37°C por 1 hora. A digestão dos vetores foi verificada através do gel de agarose 0,8%, onde a banda referente a sequência da IL-2 foi purificada

com o Kit de Purificação da Qiagen®, seguindo as orientações do fabricante. Da mesma forma da construção anterior, a mistura de ligação foi preparada com base na molaridade do vetor e do inserto (1:3). As células DH5α foram transformadas com a mistura de ligação, seguida do plaqueamento com 50μL, com incubação a 37°C *overnight*.

4.1.5 Inserção de um sítio de restrição ao vetor pSecTag-mIL2

Para a retirada da sequência sinalizadora (SS) juntamente com a IL-2, foi necessário a inserção do sítio de restrição da enzima *BamH I* ao vetor pSecTag-mIL2. Utilizamos os seguintes primers:

Sense – 5´ CGGGATCCCGATGGACACAGACACA 3´

Antisense – 5´ TCGAGCGGCCGCGCCACTGTGCTGG 3´

A reação de PCR foi realizada utilizando o MasterMix seguindo recomendações do fabricante. Realizamos duas reações de PCR, modificando apenas a temperatura de hibridização dos *primer*: 1º Reação: 95°C por 1 minuto, 48°C por 3 minutos, 72°C por 1 minuto; 2º Reação: 95°C por 1 minuto, 52°C por 3 minutos, 72°C por 1 minuto; ambas as reações em um total de 30 ciclos. A reação foi confirmada em gel de agarose 0,8%.

4.1.6 Construção do vetor pLend-IRES-IL2SN

Realizamos a digestão de 500ng do vetor pLendSN-IRES com uma unidade da enzima *BamH I* a 37°C por 1 hora, o vetor digerido foi precipitado com isopropanol e após, desfosforilado com uma unidade da enzima CIAP a 37°C por 30 minutos, sendo inativada a 85°C por 15 minutos, e novamente foi precipitado. Após a inserção do sítio de restrição ao vetor pSecTag-mIL2, o produto do PCR foi digerido com 1 unidade da enzima *BamH I* a 37°C por 1 hora, com o kit de Purificação da Qiagen®, a sequência sinalizadora juntamente com a sequência da IL-2 foram purificadas pelo gel de agarose 0,8%, seguindo as orientações do fabricante. A mistura de ligação feita com base na molaridade do vetor e do

inserto (1:3). As células DH5 α foram transformadas com a mistura de ligação, plaqueadas com 50 μ L da mistura de transformação, com incubação a 37°C *overnight*.

4.1.7 Sequenciamento do vetor pLend-IRES-IL2SN

O vetor bicistrônico pLend-IRES-IL2SN foi seqüenciado utilizando as sondas indicados pelo fornecedor do vetor pLXSN.

Sense: 5' AGC TCG TTT AGT GAA CCG TCA GAT CG 3'

Antisense: 5' ACC TAC AGG TGG GGT CTT TCA TTC CC 3'

O seqüenciamento foi realizado no Centro de Biotecnologia – Instituto Butantan/SP no laboratório do Prof.Dr. Paulo Lee Ho, utilizando BigDye v.3.1; tampão Save Money; e o seqüenciador 3100 Genetic Analyser da Applied Biosystems®.

4.2 Obtenção das células produtoras

4.2.1 Transfecção transiente em células GP+E86

As células da linhagem ecotrófica GP+E86 foram transfectadas com o vetor pLXSN (mock) e com o vetor bicistrônico pLend-IRES-IL2SN pela técnica de co-precipitação com cloreto de cálcio. Utilizamos 10 μ g do vetor pLXSN e duas concentrações para o vetor bicistrônico: 10 e 20 μ g; os vetores foram precipitados com 2,5 M CaCl₂, e posteriormente foi gotejado em um tubo contendo 1mL da solução de *Hepes.PO₄* [98% Hepes 2X pH 7.1 (0.15M Hepes; 0.5M NaCl), 2% Solução de Fosfatos pH 7.1 (70mM Na₂HPO₄, 70mM NaH₂PO₄)]. A solução ficou por 30 minutos em temperatura ambiente e depois, a solução foi colocada sobre as células GP+E86 por 20 minutos. Adicionamos 8mL de meio DMEM a placa contendo as células, que permaneceu incubadora de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, o sobrenadante contendo as partículas virais ecotróficas foi coletado,

alicotado e congelado para ser utilizado na infecção permanente. As células foram tripsinizadas, contadas e estocadas em nitrogênio líquido.

4.2.2 Transdução permanente em células GP+env+AM12

As células de linhagem anfotrófica GP+env+AM12 foram traduzidas com as partículas virais obtidas da transfecção em células GP+E86. Aproximadamente 5mL do meio das células GP+E86 juntamente com as partículas foram colocados sobre as células GP+env+AM12 juntamente com uma solução de polibreno (0,8µg/mL), permanecendo a 37°C por 3 horas com agitações suaves a cada 30 minutos. Foi adicionado 5mL de meio DMEM com polibreno em cada placa, permanecendo na incubadora de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, o meio foi removido e armazenado a -80°C. As células foram selecionadas com a adição de Geneticina G-418 (0,8mg/mL) ao meio DMEM. Os clones obtidos foram amplificados, os meios congelados a -80°C e as células foram tripsinizadas, contadas e armazenadas em nitrogênio líquido.

4.2.3 Titulação Viral

As células da linhagem NIH/3T3 foram transduzidas com as partículas virais obtidas da transdução em células GP+env+AM12. As células NIH/3T3 foram previamente cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, e plaqueadas 1x10⁶ células no dia anterior a transdução. O meio das células GP+env+AM12 contendo as partículas foi adicionado aos fibroblastos NIH/3T3 na diluição 10⁴ com adição da solução de polibreno (0,8µg/mL). Após 3 horas, com agitação a cada 30 minutos, foi adicionado meio DMEM com polibreno (0,8µg/mL), permanecendo por 48 horas na estufa. O meio foi então removido e iniciou-se a seleção com Geneticina G-418 (0,8mg/mL). Os clones foram amplificados e o meio foi congelado a -80°C. As células foram coradas com Rodamina B (C₂₈H₃₁C₁N₂O₃) numa concentração de 2% em solução de 4% de formaldeído. As colônias foram contadas, onde cada colônia corresponde a uma célula que foi infectada. A partir do número de colônias e o número de células semeadas, obtemos a unidade de formação de colônia por mililitro (UFC/mL).

4.2.4 Transdução na célula alvo

Para a obtenção de células produtoras de ES e IL-2, as partículas virais obtidas com a transdução em células GP+env+AM12 foram transduzidas em fibroblastos NIH/3T3. As células NIH/3T3 foram previamente cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, e 1×10^6 células foram plaqueadas no dia anterior a transdução. O meio de cultura contendo as partículas virais foi diluído 100X e colocado sobre os fibroblastos com uma solução de polibreno ($0,8 \mu\text{g/mL}$) por 48 horas. O meio foi removido e iniciou-se a seleção com Geneticina G-418 ($0,8 \text{mg/mL}$) por aproximadamente 10 dias. Os clones obtidos foram amplificados, o meio foi armazenado a -80°C e as células foram armazenadas em nitrogênio líquido.

4.3 Caracterização do Vetor Bicistrônico

4.3.1 Determinação da ES e IL-2

A determinação da ESe da IL-2 foi realizada através do *Dot blot*. O meio de 24 horas dos clones contendo o vetor pLend-IRES-IL2SN, juntamente com a curva padrão (endostatina comercial da Sigma®; interleucina-2 comercial da Prepotech®) foram fixados na membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, da Amersham Bioscience®). Após a fixação, a membrana foi bloqueada com TBS (10mM Tris, $0,9\% \text{NaCl}$) contendo 5% de leite desnatado por 2 hora; após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes com TBS; e posteriormente, incubada overnight com o anticorpo primário monoclonal 1:500 (anti-endostatina - Millipore®; anti-interleucina2 - eBioscience®). A membrana foi novamente lavada com TBS por três vezes, e em seguida incubada com o anticorpo secundário anti-mouse marcado com HRP na diluição 1:5000 (Upstate®) por 2 horas. A membrana foi revelada pelo kit Immobilon (Millipore®) seguindo as instruções do fabricante. A análise foi feita através do programa ImageJ (Arruda-Neto, 2009).

4.3.2 Western blot para ES e IL-2

O *Western blot* foi realizado conforme descrição de Laemmli (Laemmli, 1970). Foram aplicados 100µL do meio de cultura de cada clone. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com TBS (10mM Tris, 0,9%NaCl) contendo 5% de leite desnatado por 1 hora; após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes com TBS; e posteriormente, incubada overnight com o anticorpo primário monoclonal na diluição 1:500 (Anti-Endostatina – Chemicon®; Anti-IL2 – eBioscience®). A membrana foi novamente lavada com TBS por três vezes, e em seguida incubada com o anticorpo secundário anti-mouse marcado com HRP na diluição 1:5000 (Upstate®) por 2 horas. A membrana foi revelada pelo kit Immobilon (Millipore®) seguindo as instruções do fabricante.

4.3.3 Extração de RNA dos fibroblatos transduzidos com o vetor

Para a realização da extração do RNA do clone NIH/3T3 pLendSN e NIH/3T3 pLend-IRES-IL2SN foram 1×10^6 células e mantidas sob condições anteriormente mencionadas, até atingirem 80% de confluência. As placas foram então lavadas com PBS 1X, a cada placa foi adicionado 1mL de trizol (Sigma®), e com auxílio do “scraper” as células foram removidas. A suspensão foi transferida para tubos estéreis de 1,5mL, permanecendo por 2 horas a -20°C. Foi adicionado 200µL de clorofórmio, homogenizado manualmente por inversão e incubado em temperatura ambiente por 3 minutos. Após os tubos foram centrifugados a 12000rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o RNA foi cuidadosamente pipetado e passado para novos tubos de 1,5mL. O RNA foi precipitado com 500µL de isopropanol e após incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, foi centrifugado a 12000rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 1mL de etanol 75%, preparado com água DEPC (dietilpirocarbonato). Após nova centrifugação, o RNA foi ressuspensionado em 15µL de água DEPEC, e armazenado a -80°C. A concentração do RNA foi determinada por leitura da absorbância a 260nm em

espectrofotômetro, e para avaliar o grau de pureza foi realizada leitura da absorbância a 280nm e calculada a relação. A avaliação qualitativa foi feita em gel de agarose 0,8%.

4.3.4 Obtenção do cDNA

Para a obtenção do cDNA utilizamos 2µg de RNA. Ao RNA foi acrescentado 1µL de Oligo (dT) primer (0,1µg/µL), 1µL de deoxinucleotideo trifosfato (dNTP) 10mM, 1µL de água DEPEC, a mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C e esfriada em gelo. Após foi acrescentado 4µL de tampão 5X First Strand, e 2µL de dTT 0,1M, incubando a 42°C por 2 minutos. Após foi adicionado 1µL da enzima transcriptase reversa Super Script II (200U/µL), incubando a 42°C por 50 minutos. Para a inativação da enzima, as amostras foram mantidas por 15 minutos a 70°C. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20°C.

4.3.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

A avaliação da transcrição da ES e da IL-2 foi realizada pela técnica de RT-PCR. Utilizamos os seguintes pares de primers:

Endostatina: **Sense** 5' GAC TTC CAG CCG GTG CTC CAC 3'
Antisense 5' CAG TCA TGA AGC TGT TCT CAA T 3'

Interleucina-2: **Sense** 5' GAC ACT TGT GCT CCT TGT CA 3'
Antisense 5' TCA ATT CTG TGG CCT GCT TG 3'

Para a reação de RT-PCR utilizamos 1µL de cDNA de cada amostra, 0,2µL de SYBR Green 1% (Applied Biosystems); 0,4µL (10mM) de cada primer; e 13,64µL de H₂O DEPEC, totalizando um volume de 20µL por reação. A reação foi realizada nas seguintes condições: Desnaturação - 95°C por 30 segundos; Anelamento - 55°C por 30 segundos; Extensão - 72°C por 30 segundos. A amplificação foi realizada em 40 ciclos. Como gene endógeno para validar o

ensaio e servir de padrão interno foi utilizado o gene da β -actina, com o seguinte primer:

Sense 5' AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC 3'

Antisense 5' AGA GGC GTC CAG GGA TAG CA 3'

A reação foi realizada no termociclador Corbett Rotor Gene 3000 (Corbett).

4.3.6 Ensaio da atividade da ES em células endoteliais

A atividade da ES foi avaliada pelo ensaio de inibição do crescimento da linhagem celular HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell). Foram plaqueadas 5×10^3 células/poço em placa de cultura de 96 poços com meio RPMI com 2% SFB. Após 24 horas, o meio foi trocado pelo meio dos clones contendo o vetor Lend-IRES-IL2SN ou pelo meio do clone mock, ou pelo meio contendo IL-2 comercial nas concentrações 0.64, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04 $\mu\text{g/mL}$, contendo 10ng/mL VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor - Sigma®) por 72 horas. A inibição da proliferação celular foi medida através do Kit *Cell Titer 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega®). Foi adicionado 20 μL /poço da solução PMS/MTS (1:20), seguindo instruções do fabricante. Após 4 horas foi realizado a leitura da absorbância a 490nm utilizando o *SpectraMax 190*.

4.3.7 Ensaio da atividade da IL-2 na proliferação dos linfócitos

A atividade da IL-2 foi avaliada pelo ensaio de proliferação dos linfócitos retirados do baço do camundongo Balb/c DO11.10 (possui TCR específico para ovalbumina). Foram plaqueados 5×10^5 células/poço em placa de cultura de 96 poços em meio DMEM. Os linfócitos foram estimulados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de ovalbumina, o meio dos clones foi adicionado na diluição 1:50 juntamente com o corante CFSE (Invitrogen®) por 72 horas. Os linfócitos foram lavados e marcados com anti-CD4 e anti-CD8 (eBioscience®). A medição foi realizada por citometria

de fluxo no aparelho FACS Calibur e a análise foi feita no programa Flowjo (Frenkel, 2009).

V. RESULTADOS

5.1 Construção do vetor Lend-IRES-IL2SN

A construção do vetor bicistrônico pLend-IRES-IL2SN foi realizada em três etapas, conforme a figura 5. Inicialmente foi construído o vetor pLend-IRES-SN, posteriormente foi construído o vetor pSecTag-mIL2 e por último foi realizado a construção do vetor pLend-IRES-IL2SN.

Figura 5: Mapa da construção do vetor pLend-IRES-IL2SN. Primeira etapa – construção do vetor pLend-IRES-SN, inserção do fragmento IRES no vetor pLendSN. Segunda etapa – construção do vetor pSecTag-mIL2, inserção do cDNA da IL-2 no vetor pSecTag-2C. Terceira etapa – construção do vetor bicistrônico pLend-IRES-IL2SN, inserção do cDNA da interleucina-2 com a sequência sinalizador no vetor pLend-IRES-SN.

5.1.1 Construção do vetor pLend-IRES-SN (Primeira Etapa)

Realizamos a inserção do fragmento IRES no vetor pLendSN. Os vetores pLendSN e pIRES foram purificados e digeridos com as enzimas *Xho I* e *BamH I*.

A ligação do vetor pLendSN com o fragmento IRES resultou em 100 transformantes/placa, dos quais 10 clones foram selecionados para a análise da construção do vetor, com as enzimas *Xho I* e *BamH I*.

A eficiência da reação de ligação foi de 60%. Na figura 6, observamos a presença de duas bandas para os clones 01, 03, 04, 05, 09 e 10, a banda de 6350pb correspondendo ao vetor pLendSN linearizado e a de 636pb do fragmento IRES. O clone 10 foi selecionado para dar continuidade na construção do vetor bicistrônico.

Figura 6: Análise de restrição de 10 clones do vetor pLend-IRES-SN em gel agarose 0.8%. 1Kb – marcador de peso molecular; Lend – vetor pLendSN não digerido; Lend Dig – vetor pLendSN digerido com enzima de restrição; 1 á 10 – Clones; 100pb – marcador de peso molecular.

5.1.2 Construção do Vetor pSecTag-mIL2 (Segunda Etapa)

O vetor pSecTag-mIL2 foi construído com objetivo de inserir a sequência sinalizadora da cadeia Kappa V-J2-C murina na extremidade 5' do cDNA da IL-2, possibilitando seu direcionamento no meio extracelular.

O vetor pSecTag2C foi linearizado com a enzima *Hind III*, tratado com a enzima Klenow e *BamH I*, o vetor pUMVC3-mIL2 foi digerido com as enzimas *EcoR V* e *BamH I* para a remoção do fragmento de 523pb, correspondente ao cDNA da IL-2. A reação de ligação resultou em 80 transformantes/placa, dos quais 10 clones foram selecionados para comprovação da construção do vetor.

Os clones selecionados foram analisados com a digestão da enzima *EcoR I* (Figura 7). Nesta construção, obtivemos uma alta eficiência de ligação, com positividade em 70% dos clones selecionados. Desta construção, selecionamos o clone 03 para dar continuidade.

Figura 7: Análise de restrição de 10 clones do vetor pSecTag-mIL2 em gel agarose 0.8%. 1Kb – marcador de peso molecular; pSec – vetor pSecTag-2C não digerido; D.pSec – vetor pSecTag-2C digerido com enzima de restrição; 1 – clone 01 não digerido; D.1 a D.10 – digestão dos clones de 01 a 10.

5.1.2 Inserção de um sítio de restrição ao vetor pSecTag-mIL2

A inserção do sítio de restrição *BamH I* (GGATCC) na extremidade 5' do cDNA da IL-2 no vetor pSecTag-mIL2 foi realizada por PCR. Duas temperaturas de anelamento foram testadas. Ambas apresentaram a mesma eficiência. Na figura 8 podemos observar os *amplicons* com peso molecular esperado (700pb) e concentrações muito semelhantes.

Figura 8: Análise do produto da reação de PCR em gel agarose 0.8%. 1Kb – marcador de peso molecular; 1 e 1' – amostra com temperatura de hibridização de 48°C ; s/1 – amostra sem DNA; s/p – amostra sem primer; 2 e 2' – amostra com temperatura de hibridização de 52°C; s/2 – amostra sem DNA; s/p – amostra sem primer.

Após a verificação em gel de agarose, o amplicon foi digerido com a enzima *BamH I* e purificado.

5.1.3 Construção do Vetor pLend-IRES-IL2SN (Terceira Etapa)

O vetor pLend-IRES-SN foi linearizado com a enzima *BamH I* e tratado com a enzima CIAP, para remoção do grupamento fosfato impedindo assim a religação do vetor. Realizamos a reação de ligação, obtendo 50 transformantes/placa, dos quais 17 foram selecionados para a comprovação da construção do vetor.

O vetor pLend-IRES-SN e os clones selecionados para análise foram digeridos com a enzima *EcoR I*. De acordo com o mapa do vetor bicistrônico o sítio de restrição para a enzima *EcoR I* está presente em três regiões do vetor, sendo assim, com esta enzima podemos verificar se o inserto foi inserido de forma adequada.

A eficiência da reação de ligação foi de 50%. Alguns clones apresentaram o inserto na forma adequada, como os clones 07, 11 e 12; já os clones 02 e 16, tiveram o fragmento SS-IL-2 inserido de forma invertida (Figura 9). Nesta etapa, selecionamos o clone 12, no qual foi realizado a análise de restrição com as enzimas *Xho I* e *Sfi I*, e o seqüenciamento.

Figura 9: Análise de restrição de 17 clones do vetor pLend-IRES-IL2SN em gel agarose 0.8%. 1Kb – marcador de peso molecular; Vetor – vetor pLend0-IRES-SN digerido com a enzima de restrição; D1 a D17 – digestão dos clones de 01 a 17; M – marcador de peso molecular.

Na figura 10 verificamos um esquema do vetor com o inserção do fragmento de forma correta e invertida.

Figura 10: Esquema do vetor pLend-IRES-IL2SN com os sítios de restrição, com o fragmento inserido de forma correta (A) e na forma invertida (B)

A análise de restrição com as enzimas *Xho I*, *EcoR I* e *Sfi I* pode ser observada na figura 11. O vetor digerido com *Xho I* apresentou 7883pb. Com a enzima *EcoR I* o vetor foi digerido em três regiões, uma de 6393pb correspondente ao vetor com a IL-2, uma de 807pb correspondente a sequência IRES e a sequência sinalizadora, e outra de 683pb correspondente a ES. Com a enzima *Sfi I* o vetor foi digerido em duas regiões, o vetor contendo a ES e a sequência IRES com 6906pb, e a sequência sinalizadora, a IL-2 e um fragmento do vetor pLXSN com 977pb.

Figura 11: Análise restrição do vetor pLend-IRES-IL2SN em gel agarose 0.8%. M - marcador de peso molecular; *Xho I* – clone 12 digerido com a enzima *Xho I*; *EcoR I* – clone 12 digerido com a enzima *EcoR I*; *Sfi I* – clone 12 digerido com a enzima *Sfi I*; Lambda – vetor lambda digerido com *HindIII*, para quantificação do DNA.

5.1.4 Sequenciamento do vetor pLend-IRES-IL2SN

O sequenciamento do vetor pLend-IRES-IL2SN foi realizado utilizando primers complementares ao vetor pLXSN. A sequência de nucleotídeos encontrada nas regiões 5' e 3' foram comparadas com o banco de dados *BLAST Assembled Genomes* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>), comprovando a presença da sequência sinalizadora anteriormente a sequência da ES (Figura 12) e a sequência da IL-2 (Figura 13).

Figura 12: Sequenciamento da extremidade 5' da construção bicistrônica. Sequência sinalizadora e da endostatina comparada com o banco de dados *BLAST Assembled Genomes* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

O vetor bicistrônico apresentou uma homologia de 96% com a sequência kappa (sinalizadora) e 100% de homologia com a sequência da ES (Figura 12). Com relação a IL-2, a homologia foi de 99% (Figura 13).

Figura 13: Seqüenciamento da extremidade 3' da construção bicistrônica. Interleucina-2, comparação com o banco de dados *BLAST Assembled Genomes* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

5.2 Obtenção das células produtoras

5.2.1 Transfecção transiente em células GP+E86

As células de empacotamento GP+E86 foram previamente cultivadas, aproximadamente 1×10^6 células foram plaqueadas e incubadas á 37°C com 5% CO₂. Após 24 horas, o vetor pLend-IRES-IL2SN nas concentrações de 10µg e 20µg foi co-precipitado com cloreto de cálcio como descrito, e posteriormente colocado sobre as células. O sobrenadante das células transfectadas foi coletado após 24 horas, armazenado á 80°C e as células foram tripsinizadas e armazenadas em nitrogênio líquido.

Figura 14: Células GP+E86 após transfecção. **A** – Controle; **B** – Células transfectadas com 10µg do vetor bicistrônico; **C** – Células transfectadas com 20µg do vetor bicistrônico. (Aumento 10x)

Na Figura 14, observamos as células GP+E86 após a transfecção. Não observamos qualquer alteração fenotípica nas células transfectadas com 10µg ou 20µg do vetor bicistrônico.

5.2.1 Transdução permanente em células GP+env+AM12

As células anfitriãs GP+env+AM12 foram cultivadas previamente, 1×10^6 células foram plaqueadas. Após 24 horas, as células foram transduzidas com as partículas virais presentes no sobrenadante coletado das células GP+E86, seguindo a metodologia descrita.

A seleção dos clones foi iniciada após 24 horas, utilizando Geneticina G-418 (0,8mg/mL). Após aproximadamente 10 dias de seleção o controle positivo já não apresentava nenhuma célula viável, diferente das placas transduzidas com o vetor pLend-IRES-IL2SN, onde as células se apresentavam viáveis e atingindo a semi-confluência (Figura 15).

Figura 15: Células GP+env+AM12 após 10 dias da transdução. **A** – Controle, presença de aglomerado de células mortas decorrente da presença da G-418; **B** – Células viáveis transduzidas com as partículas obtidas da transfecção com 10µg do vetor; **C** – Células viáveis transduzidas com as partículas obtidas da transfecção com 20µg do vetor. (Aumento de 10x)

Não observamos alteração na eficiência de transdução com o meio das células GP+E86 de 10µg e 20µg do vetor. Selecionados 25 clones que foram amplificados até atingir 85% de confluência, congelamos o meio a -80°C, as células foram tripsinizadas e armazenada em nitrogênio líquido.

5.2.2 Titulação Viral

As células NIH/3T3 foram cultivadas, 1×10^6 células foram plaqueadas e após 24 horas foram transduzidas com uma diluição de 10^4 do meio obtido na transdução permanente, contendo as partículas virais anfitriãs.

A seleção foi realizada como anteriormente, utilizando Geneticina (0,8 mg/mL) por aproximadamente 10 dias. Seleccionamos 16 clones, que foram amplificados e o meio de 24 e 48 horas foram armazenados a -80°C ; as células foram lavadas e coradas com o corante não vital Rodamina B 2% (Figura 16) para a contagem das colônias formadas. Cada colônia equivale a uma célula infectada pela partícula viral, valor expresso em unidade de formação de colônia por mL (UFC/mL).

Figura 16: Células coradas com Rodamina B 2%: A – placa do clone 18; B – placa do clone 15.

Os títulos virais variaram entre 4.20×10^5 e 1.53×10^6 UFC/mL (Tabela 1). Estes valores condizem com o tipo de vetor retroviral utilizado e está dentro dos padrões relatados na literatura (Bellini, 2003; Beissel, 2007; Kisgati, 2007).

Tabela 1: Titulação viral em células NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN

Clone	Quantidade de Partícula Viral (UFC/mL)
01	1.15×10^6
02	4.10×10^5
03	5.40×10^5
04	9.40×10^5
05	4.20×10^5
06	1.29×10^6
07	4.60×10^5
08	8.00×10^5
09	1.46×10^6
10	1.20×10^6
11	8.70×10^5
12	9.50×10^5
13	1.13×10^6
14	1.42×10^6
15	1.53×10^6
16	5.60×10^5

Selecionamos o clone 15 que apresentou maior produção de partículas virais, 1.53×10^6 UFC/mL, para realizarmos a próxima etapa.

5.2.1 *Transdução na célula alvo*

As células NIH/3T3 foram transduzidas e selecionadas com Geneticina por aproximadamente 10 dias. Nove clones que foram amplificados, sendo o meio de cultura armazenado a -80°C e as células em nitrogênio líquido.

5.3 Caracterização do vetor Bicistrônico

5.3.1 Determinação da ES e IL-2

A concentração de ES e a IL-2 foram determinadas pela técnica do *Dot blot*. Os sinais obtidos na membrana de raio-X pela ES e IL-2 comercial foram medidos no programa ImageJ (ES - Figura 17-A; IL-2 Figura 17-C). Os valores das áreas (pixel^2) foram correlacionados com as concentrações protéicas gerando as curvas e as equações correspondentes (ES - Figura 17-B; IL-2 Figura 17-D).

Figura 17: Curvas Padrão para determinação da ES e IL-2. **A** – *Dot blot* para ES utilizando ES comercial nas concentrações 2, 1, 0.5, 0.25 $\mu\text{g/mL}$; realizado em triplicata. **B** – Gráfico gerado pelas medições obtidas pelo *Dot blot* da ES comercial. **C** - *Dot blot* para IL-2 utilizando IL-2 comercial nas concentrações 1, 0.5, 0.25, 0.12 $\mu\text{g/mL}$; realizado em triplicata. **D** – Gráfico gerado pelas medições obtidas pelo *Dot blot* da IL-2 comercial.

Realizamos então, o *dot blot* para ES (Figura 18-A) e IL-2 (Figura 18-B) com o meio de cultura de 24 horas dos clones. Utilizando o mesmo programa, mensuramos a área de cada clone e então determinamos a ES e IL-2 produzida pela NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN.

Figura 18: *Dot blot* com o meio de cultura de 24 horas de fibroblastos transduzidos com o vetor bicistrônico (clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). **A** – *Dot blot* para ES. **B** – *Dot blot* para IL-2.

Os valores gerados pela equação da reta foram expressos em $\mu\text{g/mL.24h}$ e posteriormente convertidos para $\mu\text{g}/10^6\text{cels.24h}$ e calculado a razão entre ES e IL-2 (Tabela 2). A ES produzida pela NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN variou de 1.08 a $1.62\mu\text{g}/10^6\text{cels.24h}$, quantidade semelhante a produzida pelo vetor monocistrônico (0.151 a $1.125\mu\text{g}/10^6\text{cels.24h}$). Já a produção de IL-2 variou de $0.66 - 0.89\mu\text{g}/10^6\text{cels.24h}$.

Tabela 2: Concentrações de ES e IL-2 secretadas pelos clones NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN

Clones	Endostatina $\mu\text{g}/10^6\text{cel.24h}$	Interleucina-2 $\mu\text{g}/10^6\text{cel.24h}$	Razão ES/IL-2
1	1.46	0.89	1.64
2	1.08	0.69	1.56
3	1.62	0.89	1.82
4	1.17	0.71	1.64
5	1.09	0.66	1.65
6	1.62	0.87	1.86
7	1.39	0.89	1.56
8	1.08	0.72	1.50

9	1.18	0.69	1.71
---	------	------	------

A razão das concentrações protéicas ES/IL-2 foi constante em todos os clones.

5.3.2 Western blot

O *Western blot* foi realizado com os clones 1, 3 e 6, escolhidos após a determinação da ES e IL-2.

Figura 19: Análise por *Western blot* do meio de cultura dos clones NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN 1, 3 e 6. **A** – *Western blot* para ES, confirmando o peso molecular da ES de 20kD, e o controle positivo(C+) com a ES comercial. **B** – *Western blot* para IL-2, confirmando o peso molecular da IL-2 de 15kD, e o controle positivo (C+) com a IL-2 comercial.

A ES e IL-2 produzidas apresentaram os padrões de pesos moleculares, compatíveis com os padrões comerciais (Figura 19-A e B).

NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN clone 3 apresentou os maiores níveis das duas proteínas recombinantes e foi escolhido para os ensaios posteriores.

5.3.3 Análise qualitativa do RNA extraído dos clones NIH/3T3 – pLXSN e NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN

A qualidade do RNA foi confirmada em gel de agarose 0,8% (Figura 20).

Figura 20: Avaliação da integridade do RNA em gel de agarose 0.8%. 100pb – marcador 100pb; CL 3 I – RNA extraído do NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN clone 3, primeira duplicata; CL 3 II – RNA extraído do NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN clone 03, segunda duplicata; Mock I – RNA extraído da célula Mock, primeira duplicata; Mock II – RNA extraído da célula Mock, segunda duplicata.

5.2.1 Avaliação da expressão da ES em NIH/3T3 – pLendSN e NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2N

A avaliação da expressão da ES em NIH/3T3 – pLendSN e NIH3T3 – pLend-IRES-IL2SN foram avaliadas por RT-PCR, utilizando a β -actina como gene endógeno. Os dados (Ct) obtidos pelo programa foram analisados no Excel (Microsoft) pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Peinnequin, 2004; Peirson, 2003; Yang, 2004; Beissel, 2007), e os resultados estão expostos na tabela 3. A expressão da ES em NIH/3T3 pLendSN foi usado como padrão.

Tabela 3: Relação da expressão da ES em NIH/3T3 – pLendSN e NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN.

	ES média $\pm$ erro padrão	B-actina $\pm$ erro padrão	ΔC_t^* (ES)	$\Delta\Delta C_t^*$ (ES)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ (ES)
NIH/3T3 pLendSN	18.45 $\pm$ 0.10	12.12 $\pm$ 0.05	6.33 $\pm$ 0.007	0.00 $\pm$ 0.007	1
NIH/3T3 pLend-IRES-IL2SN	17.32 $\pm$ 0.13	12.12 $\pm$ 0.05	5.20 $\pm$ 0.03	1.13 $\pm$ 0.03	2.19

* ΔC_t – média dos valores encontrados pela amostra em relação ao gene endógeno, β -actina.

** $\Delta\Delta C_t$ – diferença entre o ΔC_t

A expressão da ES em NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN foi superior em 2 vezes a expressão da ES em NIH/3T3 – pLendSN (Figura 21).

Figura 21: Gráfico demonstrativo da relação da expressão do RNAm da endostatina e β -actina obtida em RT-PCR. Os resultados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Valores apresentados com média $\pm$ EP (* $p < 0.001$).

5.2.1 Ensaio de inibição do crescimento em células endoteliais

A atividade da ES produzida em NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN foi verificada em células endoteliais, com as seguintes diluições do meio 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, utilizando como controle o meio do *mock* e meio contendo IL-2 comercial nas concentrações 0.64; 0.32; 0.16; 0.08; 0.04 $\mu\text{g/mL}$.

Na figura 22, verificamos que tanto o meio do *mock*, quanto a IL-2 não inibiram o crescimento das células endoteliais. A ES produzida pela NIH/3T3 – pLend-IRES-IL2SN clone 3 inibiu aproximadamente 40% o crescimento das células endoteliais com o meio não-diluído com uma significância de $p < 0,0001$ (*).

Figura 22: Inibição do crescimento de células endoteliais pela ES produzida Clone 3. Mock – não apresentou inibição do crescimento. IL-2 – meio contendo IL-2 comercial na concentração 0.64µg/mL e suas diluições. Clone 3 – apresentou inibição do crescimento proporcional a diluição do meio, com uma significância de $p < 0,0001$ (*) para o meio não diluído.

5.2.1 Ensaio de proliferação linfocitária

A atividade da IL-2 foi avaliada pelo ensaio de proliferação dos linfócitos. Os linfócitos com receptor TCR para ovalbumina foram estimulados com ovalbumina e com o meio de cultura de 48 horas, na diluição 1:50. A proliferação de CD4 e CD8 foi verificada pelo corante CFSE, tendo como controle meio com ovalbumina, meio do clone mock e o clone NIH/3T3 – pLendSN.

Os controles apresentaram o mesmo padrão e os linfócitos CD4 e CD8 proliferaram 10.6% e 8.9%, respectivamente (Figura 23). Não observamos nenhuma morte celular devido a concentração da IL-2, uma vez que em altas concentrações pode promover a morte dos linfócitos e não sua proliferação.

Figura 23: Proliferação linfocitária de CD4 e CD8 pela IL-2 produzida pelo CL 3. A proliferação de CD4 foi de 10.6% e de CD8, 8.9%; como controle negativo utilizamos o meio do mock.

VI. DISCUSSÃO

Atualmente, existem vários tipos de vetores de transferência gênica capazes de endereçar um ou mais genes para células alvo. A demanda de vetores multicistrônicos tem crescido nos últimos anos tanto na pesquisa básica quanto nas aplicações clínicas da terapia gênica (Seth, 2005; Goverghana, 2006; Pfutzner, 2008).

A expressão de dois ou mais genes requer o uso de estratégias de co-expressão que vão desde proteína de fusão até o emprego da sequência IRES. A sequência IRES permite ao vetor produzir múltiplos genes em um único RNA mensageiro, eliminando a perda da expressão gênica decorrente de competição por promotores ou da co-transfecção (Allera-Moreau, 2007).

Neste trabalho construímos o vetor bicistrônico (pLend-IRES-IL2SN) expressando duas proteínas promissoras para a terapia gênica anti-tumoral. Uma proteína, a ES, com ação anti-angiogênica, e outra, a IL-2 com ação no sistema imune, promovendo a proliferação linfocitária. A estratégia adotada para a construção do vetor foi eficiente, sendo comprovada pelo seqüenciamento do vetor.

O vetor pLend-IRES-IL2SN possui 1329pb, sequência IRES e cDNA da IL-2, a mais que o vetor pLendSN. Essa diferença não ultrapassou o tamanho máximo de inserto permitido para o vetor retroviral LXS_N, que é de até 9Kb (Castro, 1999; Romano, 2006). A adição desse fragmento também não interferiu na capacidade de produção de partículas virais, pois os níveis apresentados foram semelhantes aos apresentados pelo vetor pLendSN e com os valores citados na literatura para vetores retrovirais (Metz, 1996; Dani, 1999; Coutinho, 2007).

Os níveis de ES variou entre 1,08 a 2,08µg/10⁶cels.24h, valores superiores a ES produzida pelo clone NIH/3T3 pLendSN (0,151 – 1,125 µg/10⁶cels.24h). A integração dos genes, no genoma da célula hospedeira, pela maquinaria retroviral é aleatória, portanto o aumento dos níveis de expressão da ES pode ter sido ocasionado pela integração do vetor bicistrônico em uma região que favoreceu a transcrição desse gene. Estes dados foram validados pelo resultado obtido pela técnica de RT-PCR.

A quantidade de IL-2 produzida pelo clone NIH/3T3 pLend-IRES-IL2SN, 0,66 – 0,89µg/10⁶cels.24h, foi superior aos valores encontrados na literatura (Shinohara, 1997; Nagashima, 1998; Govaerts, 1999). Entretanto, quando comparada com a produção de ES, a razão ficou entre 1,50 – 1,86, dados validados pelo *Western blot*. É sabido, que a transcrição IRES-dependente é menor que a CAP-dependente (Pfutzner, 2008), o que justificaria a maior produção de ES do que IL-2, já que a ES localizada no primeiro cistron tem sua transcrição CAP-dependente e a IL-2 localizada no segundo cistron, transcrição IRES-dependente. Essa diferença é pequena quando comparada com a encontrada por outros autores. Wang *et al* relataram que o gene da dopamina com transcrição CAP-dependente teve sua expressão dez vezes superior a da timidina quinase, IRES-dependente (Wang, 2005). Já Chinnasamy *et al* verificaram que o gene IRES-dependente teve sua expressão oito vezes menor que a CAP-depenente (Chinnasamy, 2006).

Uma importante característica observada neste trabalho é que esta construção bicistrônica, integrada no genoma das células NIH/3T3, propiciou uma razão de expressão praticamente constante entre os genes. Esta característica facilitará a aplicação desta ferramenta em ensaios *in vivo*. É importante salientar que em outras técnicas de expressão multicistrônicas, como por exemplo, a co-transfecção, os níveis de expressão dos genes varia bastante (Chung-Faye, 2001).

A ES produzida pelo clone NIH/3T3 pLend-IRES-IL2SN promoveu uma inibição da proliferação de células endoteliais de 40% em relação aos controles. Entretanto, o clone NIH/3T3 pLendSN inibiu 57% a proliferação de células endoteliais. A discrepância dos valores pode ser justificada pelo número de passagens da linhagem endotelial disponível em nosso laboratório. Sabe-se que o aumento do número de passagens interfere nos receptores, alterando a ação da ES. Se compararmos com os valores encontrados na literatura, que variam de 30-50% de inibição (Yoon, 1999; Wang, 2002; Mi, 2006), a ES produzida pelo clone NIH/3T3 pLend-IRES-IL2SN está sendo produzida em quantidades satisfatórias e está promovendo sua atividade anti-angiogênica.

A atividade da IL-2 foi verificada pela proliferação linfocitária. Como descrito, os níveis de IL-2 foram superiores aos encontrados na literatura, porém

é de fundamental importância salientar que tais níveis não foram tóxicos aos linfócitos, pois não observamos morte celular superior aos níveis esperados pela técnica (Nelson, 2004; Kamikawa, 2008).

Tanto a ES quanto a IL-2 possuem meia-vida circulante muito baixa (IL-2 de 5 – 10 minutos; ES de aproximadamente 2 horas) (Stagg, 2004; Lee, 2008). Tal fato compromete a eficácia do tratamento e exige a busca de doses e esquemas terapêuticos mais eficientes.

Terapeuticamente, a ES pode ser utilizada em bolus ou por administração contínua. Trabalhos relatam que o potencial terapêutico da ES aumenta significativamente quando ela é administrada por infusão contínua (Kisker, 2001; Kuroiwa, 2003). Capillo *et al* em 2003 relataram que a ES administrada por infusão contínua promoveu, além da redução dos vasos tumorais, a diminuição do potencial clonogênico das células progenitoras endoteliais (Capillo, 2003) .

A terapia anti-tumoral com altas doses de IL-2 tem sido usada em tumores metastáticos renal e melanoma. No tratamento do tumor renal essa imunoterapia tem sido eficaz em até 20% dos pacientes (Klapper, 2008). Em pacientes com melanoma a eficácia está entre 10 a 20 % (Atkins, 2000). Além da eficácia relativamente baixa, os efeitos tóxicos da IL-2 ocasionam complicações, quase sempre reversíveis, que podem exigir internação em terapia intensiva. Pacientes com tumor renal metastático, tratados com doses reduzidas, administradas em períodos prolongados e associadas ao interferon alfa, resultaram em menor toxicidade aguda (Pavone, 2001). Igualmente, pacientes com melanoma metastático, tratados com baixas doses de IL-2 em conjunto com outras drogas, apresentaram um aumento na sobrevida (Cão, 2005).

Em termos farmacológicos a expressão constitutiva da IL-2 em baixas concentrações, poderia ser uma opção terapêutica para minimizar a toxicidade da IL-2. Além disso, poderia manter a concentração plasmática em níveis terapêuticos contornando o problema da meia-vida curta dessas duas proteínas recombinantes.

A conjugação de drogas, visando o sinergismo, é uma prática comum na oncologia. Acreditamos que o tratamento conjugado com uma molécula anti-

angiogênica e uma moduladora da resposta imune possa ser uma interessante proposta terapêutica para o câncer.

Em suma, acreditamos que o vetor pLend-IRES-IL2SN seja uma ferramenta interessante no estudo farmacocinético da ES e IL-2, estudos de biologia celular e molecular de tumores bem como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o câncer.

VII. CONCLUSÕES

- ✓ A estratégia adotada para a construção do vetor bicistrônico foi eficaz.
- ✓ O vetor bicistrônico obteve uma ótima eficiência de transfecção.
- ✓ O vetor bicistrônico apresentou altos níveis de produção da ES e da IL-2. Entretanto a proteína CAP-dependente, ES, apresentou níveis maiores que a proteína IRES-dependente, IL-2.
- ✓ A análise do RNAm do vetor bicistrônico mostrou um aumento na expressão da ES de 2 vezes em relação do vetor monocistrônico.
- ✓ A ES recombinante secretada promoveu uma inibição de 40% na proliferação das células endoteliais.
- ✓ A IL-2 recombinante secretada promoveu a proliferação de linfócitos do tipo CD4 e CD8.
- ✓ O clone pLend-IRES-IL2SN 3 é uma excelente ferramenta para os ensaios *in vivo*.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLERA-MOREAU, C; CHOMARAT, P; AUDINOT, V; COGÉ, F; GILLARD, M; MARTINEAU, Y; BOUTIN, JA; PARTS, A-C. The use of IRES-based bicistronic vectors allows the stable expression of recombinant G-protein coupled receptors such as NPY5 and histamine 4. **Biochemie**; v.88; p.737-746; 2006.

ALTANER, C. Prodrug cancer gene therapy. **Cancer Lett.**; v.270; p.191-201; 2008.

ARFI, A; BOURGOIN, C; BASSO, L; EMILIANI, C; TANCINI, B; CHIGORNO, V; LI, YT; ORLACCHIO, A; POENARU, L; SONNINO, S; CAILLAUD, C. Bicistronic lentiviral vector corrects beta-hexosaminidase deficiency in transduced and cross-corrected human Sandhoff fibroblasts. **Neurobiol Dis**, v. 20(2); p.583-593; 2005.

ARRUDA-NETO, JDT; FRIEDBERG, EC; BITTENCOURT-OLIVEIRA, MC; CAVALCANTE-SILVA, E; SCHENBERG, ACG; RODRIGUES, TE; GARCIA, F; LOUVISON, M; PAULA, CR; MESA, J; MORON, MM; MARIA, DA; GENOFRE, GC. Static electric fields interfere in the viability of cells exposed to ionising radiation. **J Radiat Biol**; v.85(4); p.314-321; 2009.

ATKINS, MB; KUNKEL, L; SZNOL, M; ROSENBERG, SA. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. **Cancer J Sci Am**; v.6(1); p.11-14; 2000.

BAIRD, SD; TURCOTTE, M; KORNELUK, RG; HOLCIK, M. Searching for IRES. **RNA**; v.12; p.1755-1785; 2006.

BARZON, L; BONAGURO, R; CASTAGLIUOLO, I; CHILOSI, M; GNATTA, E; PAROLIN, C; BOSCARO, M; PALÚ, G. Transcriptionally targeted retroviral vector for combined suicide and immunomodulating gene therapy of thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab**; v. 87(11); p.5304-5311; 2002.

BALVAY, L; RIFO, RS; RICCI, EP; DECIMO, D; OHLMANN, T. Structural and functional diversity of viral IRESes. **Biochim Biophys Acta**; v.1789(9-10); p.542-557, 2009.

BEISSEL, B; SILVA, IDCG; PESQUERO, JB; RUSSO, J; SCHOR, N; BELLINI, MH. S phase reduction in the T47D human breast cancer epithelial cells induced by na S100P antisense-retroviral construct. **Onc Rep**; v.17(3); p.611-615; 2007.

BELLINI, MH; PERONI, CB; BARTOLINI, P. Increased in weight of growth hormone (GH) and immune-deficient (lit/scid) dwarf mice following grafting of hGH secreting primary human keratinocytes. **Faseb J**; v.17(15); p.2322-2324; 2003.

BLEIZIFFER, O; ERIKSSON, E; YAO, F; HORCH, RE; KNESER, U. Gene Transfer strategies in tissue engineering. **J Cell Mol Med**; v.11(2); p.206-223; 2007.

BOEHLE, AS; KURDOW, R; SCHULZE, M; Kliche, U; SIPOS, B; SOONDRUM, K; EBRAHIMNEJAD, A; DOHRMANN, P; KALTHOFF, H; HENNEBRUNS, D; NEUMAIER, M. Human endostatin inhibits growth of human non-small-cell lung cancer in a murine xenotransplant model. **Int J Cancer**; v.94(3); p.420-428; 2001.

BUTTERFIELD, L. Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer. **Swiss Med Wkly**; v.137; p.83-90, 2007.

CASTRO, MG. Gene therapy strategies for the treatment of pituitary tumors. **J Mol Endocrin**; v.22; 9-18; 1999.

CAO, MG; PUIG, S; MALVEHY, J; HERRERO, JE; MARTÍ, RM; CONILL, C; SANCHEZ, M; MELLADO, B; GASCON, P; CASTEL, T. Biochemotherapy with low doses of subcutaneous interleukin-2 in patients with melanoma: results of a phase II Trial. **Clin Transl Oncol**; v.7(6); p.250-254; 2005.

CAPILLO, M; MANCUSO, P; GOBBI, A; MONESTIROLI, S; PRUNERI, G; DELL'AGNOLA, C; MARTINELLI, G; SHULTZ, L; BERTOLINI, F. Continuous infusion of endostatin inhibits differentiation, mobilization and clonogenic potential of endothelial cell progenitors. **Clin Cancer Res**; v.9; p.377-383; 2003.

CIVALLERO, M; BARNI, S; NARRO, R; CAPELLI, E. Dendritic cells and interleukin-2: cytochemical and ultrastructural study. **Histol Histopathol**; v.15; p.1077-1085; 2000.

CHINNASAMY, D; MILSOM, MD; SHAFFER, J; NEUENDELFT, J; SHAABAN, AF; MARGISON, GP. Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI. **Virology**; v.3(14); p.1-16; 2006.

CHUNG-FAYE, GA; CHEN, MJ; GREEN, NK; BURTON, A; ANDERSON, D; MAUTNER, V; SEARLE, PF; KERR, DJ. In vivo gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated, transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. **Gene Ther**; v.8; p.1547-1554; 2001.

COUTINHO, EL; CHAMMAS, R; MORGANTI, L; SCHOR, N; BELLINI, MH. Anti-tumor effect of endostatin mediated by retroviral gene transfer in mice bearing renal cell carcinoma. **Faseb J**, 2007.

DALBA, C; BELLIER, B; KASAHARA, N; KLATZMANN, D. Replication-competent vectors and empty virus-like particles: new retroviral vector designs for cancer gene therapy or vaccines. **Mol Ther**, v.15(3); p.457-466; 2007.

DANI, SU. The challenge of vector development in gene therapy. **Brazilian J of Medical and Biol Res**; v.32; p.133-145; 1999.

DIXELLIUS, J; CROSS, MJ; MTSUMOTO, T; CLAEISSON-WELSH, L. Endostatin action and intracellular signaling: β -catenin as a potencial target? **Cancer Let**; v.196; p.1-12; 2003.

DOUGAN, M e DRANOFF, G. Immune therapy for cancer. **Annu Rev Immunol**; v.27; p.83-117; 2008.

DRUCKER, B. Renal cell carcinoma: current status and future prospects. **Cancer Treat Rev**; v.31; p.536-545; 2005.

DULLAERS, M; MEIRVENNE, SV; HEIRMAN, C; STRAETMAN, L; BANEHILL, A; AERTS, JL; THIELEMANS, K; BRECKPOT; K. Induction of effective therapeutic antitumor immunity by direct in vivo administration of lentiviral vectors. **Gene Ther**; v.13; p.630-640; 2006.

EDER JR, JP; SUPKO, JG; CLARK, JW; PUCHALSKI, TA; GARCIA-CARBONERO, R; RYAN, DP; SHULMAN, LN; PROPER; J; KIRVAN, M; RATTNER, B; CANNORS, S; KLOGAN; MT; JANICK, MJ; FOLGER, WE; SCHNIPPER, L; KINCHLAN, N; SIDOR, C; PHILLIPS, E; FOLKMAN, J; KUFE, DW. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. **J Clin Oncol**; v.20; p.3772-3784; 2002.

FAYE, C; MOREAU, C; CHAUTARD, E; JETNE, R; FUKAI, N; FLORENCE, R; HUMPHRIES, MJ; OLSEN, BR; RICARD-BLUM, S. Molecular interplay between endostatin, integrins and heparin sulfate. **J Biol Chem**; v.284(33); p.22029-22040; 2009.

FELBOR, U; DREIER, L; BRYANT, RA; PLOEGH, HL; OLSEN, BR; MOTHES, W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. **Embo J**; v.19(6); p.1187-1194; 2000.

FRENKEL, D; PACHORI, AS; ZHANG, L; DEMBINSKY-VAKNIN, A; FARFARA, D; PETROVIC-STOJKOVIC, S; DZAU, VJ; WEINER, HL. Nasal vaccination with troponin reduces troponin specific T-cell responses and improves heart function in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Inter Immuno**; v.21(7); p.817-829; 2009.

GAFFEN, SL e Liu, KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**; v.28; p.109-123; 2004.

GIFFORD, SM; GRUMMER, MA; PIERRE, SA; AUSTIN, JL; ZHENG, J; BIRD, IM. Functional characterization of HUVEC-CS: Ca^{2+} signaling, ERK $\frac{1}{2}$ activation, mitogenesis and vasodilator production. **J Endo**; v.182; p.485-499; 2004.

GOVAERTS, A-S; GUILLAUME, T; ANDRÉ, M; BAYAT, B; FEYENS, A-M; HAWLEY, TS; FONG, AZC; HAWLEY, RG; SYMANN, M. Retroviral-mediated transfer of genes encoding interleukin-2 and interleukin-12 into fibroblasts increases host antitumor responsiveness. **Cancer Gene Ther**; v.6(5); p.447-455; 1999.

GOVERGHANA, S; PUNTEL, M; XIONG, W; ZIRGER, JM; BARCIA, C; CURTIN, JF; SOFFER, EB; MONDKAR, S; KING, GD; HU, S; SCIASCIA, SA; CANDOLFI, M; GREENGOLD, DS; LOWENSTEIN, PR; CASTRO, MG. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. **Curr Gene Ther**; v.6(4); p.421-438; 2006.

GRETEN, TF; KORANGY, F; MANNS, MP; MALEK, NP. Molecular therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma. **British J Cancer**; v.100(1); p.19-23; 2008.

GUIDA, M e COLUCCI, G. Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma: is it a therapeutic option yet? **Annals Onco**; v.18(6); p.149-152; 2007.

HAHM, SH; YI, Y; LEE, DK; NOH, MJ; YUN, L; HWANG, S; LEE, KH. Construction of retroviral vectors with enhanced efficiency of transgene expression. **J Virol Meth**; v.121; p.127-136; 2004.

HANAHAN, D e FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**; v.86(3); p.353-364; 1996.

HELJASVAARA, R; NYBERG, P; LUOSTARINEN, J; PARIKKA, M; HEIKKILA, P; REHN, M; SORSA, T; SALO, T; PIHLAJANIEMI, T. Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. **Ex Cell Res**; v.307; p.292-304; 2005.

HERBST, RS; HESS, KR; TRAN, HT; TSENG, JE; MULKANI, NA; CHAMSANGAVEJ, C; MODDEN, T; DAVIS, DW; MCCONKEY, DJ; O'REILLY, MS; ELLIS, LM; PLUDA, J; HONG, WK; ABBRUZZESE, JL. Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. **J Clin Onco**; v.20(18); p.3792-3803; 2002.

HOYER, KK; DOOMS, H; BARRON, L; ABBAS, AK. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. **Immuno Rev**; v.226; p.19-28; 2009.

JOHN, H e FORSSMANN, WG. Determination of the disulfide bond pattern of the endogenous and recombinant angiogenesis inhibitor endostatin by mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**; v.15; p.1222-1228; 2001.

KAMIKAWA, S; SUGIMOTO, T; ASAI, T; ISHII, K; KIM, T. Pharmacokinetic study of interleukin-2 following intravenous injection in hemodialysis patients with renal cell carcinoma. **Ther Apheresis Dialysis**; v.12(1); p.67-71; 2008.

KIRKWOOD, JM; TARHINI, AA; PANELLI, MC; MOSCHOS, SJ; ZAROOUR, HM; BUTTERFIELD, LH; GOGAS, HJ. Next generation of immunotherapy for melanoma. **J Clin Oncology**; v.26(20); p.3445-3455; 2008.

KISGATI, M e ASMIS, R. Generation of retroviruses for the overexpression of cytosolic and mitochondrial glutathione reductase in macrophages in vivo. **Cytotechn**; v.54; p.5-14; 2007.

KISKER, O; BECKER, CM; PROX, D; FANNON, M; D'AMATO, R; FLYNN, E; FOGLER, WE; SIM, BK; ALRED, EN; PIRIE-SHEPHERD, SR; FOLKMAN, J. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. **Cancer Res**; v.61; p.7669-7674; 2001.

KLAPPER, JA; DOWNEY, SG; SMITH, FO; YANG, JC; HUGHES, MS; KAMMULA, US; SHERRY, RM; ROYAL, RE; STEINBERG, SM; ROSENBERG, S. High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. **Cancer**, v.113(2); p.293-301; 2008.

KUROIWA, M; TAKEUCHI, T; LEE, JH; YOSHIZAWA; HIRATO, J; KANEKO, S; CHOI, SH; SUZUKI, N; IKEDA, H; TSUCHIDA, Y. Continuous versus intermittent administration of human endostatin in xenografted human neuroblastoma. **J Pediatr Surg**; v.38(10); p.1499-1505; 2003.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**; v.227(5259); p.680-685; 1970.

LEE, TY; TJIN THAM SJIN, RM; MOVAHEDI, S; AHMED, B; PRAVDA, EA; LO, KM; GILLIES, SD; FOLKMAN, J; JAVAHERIAN, K. Linking antibody Fc domain to endostatin significantly improves endostatin half-life and efficacy. **Clin Cancer Res**; v.14(5); p.1487-1493; 2008.

LI, GC; YANG, JM; NIE, MM; SU, CG; SUN, LC; QIAN, YZ; FANG, GE; SHAM, J; WU, MC; QIAN, QJ. Potent antitumoral effects of a novel gene-viral therapeutic system CNHK300-mEndostatin in hepatocellular carcinoma. **Chin Med J**; v.118(3); p.179-185; 2005.

LIRA, CBB; CHU, K; LEE, YC; HU, MCT; LIN, SH. Expression of the extracellular domain of OB-cadherin as an Fc fusion protein using bicistronic retroviral expression vector. **Prot Expr Purif**; v.61; p.220-226; 2008.

LIU, F; TAN, G; LI, J; DONG, X; KRISSANSEN, GW; SUN, X. Gene transfer of endostatin enhances the efficacy of doxorubicin to suppress human hepatocellular carcinomas in mice. **Cancer Sci**; v.98(9); p.1381-1387; 2007.

LOSPITÃO, E; PEREZ-FERREIRO, CM; GOSALBEZ, A; ALONSO, MA; CORREAS, I. Na internal ribosome entry site element directs the synthesis of the 80kDa isoforms of protein 4.1R. **BMC Biol**; v.6(51); p.1-12; 2008.

MARGOLIN, K. Cytokine therapy in cancer. **Expert Opin Biol Ther**; v.8(10); p.1495-1505; 2008.

MARKOWITZ, D; GOFF, S; BANK, A. A safe packaging line for genes transfer: separating viral genes on two different plasmids. **J Virol**; v.62; p.1120-1124; 1988A.

MARKOWITZ, D; GOFF, S; BANK, A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. **J Virol**; v.167; p.400-406; 1988B.

MARTIN, P; ALBAGLI, O; POGGI, MC; BOULUKOS, KE; POGNONEC, P. Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity. **BMC Biotech**; v. 6(4); p.1-9; 2006.

MATSUNO, H; YUDOH, K; UZUKI, M; NAKAZAWA, F; SAWAI, T; YAMAGUCHI, N; OLSEN, BR; KIMURA, T. Treatment with the angiogenesis inhibitor endostatin: anovel therapy in rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**; v.29; p.890-895; 2002.

METZ, MZ; MATSUMOTO, L; WINTERS, KA; DOROSHOW, JH; KANE, SE. Bicistronic and two-gene retroviral vectors for using MDR1 as a selectable marker and a therapeutic gene. **Virology**; v.217(1); p.230-241; 1996.

MI, J; SARRAF-YAZDI, S; ZHANG, X; CAO, Y; DEWHIRST. MW; KONTOS, CD; LI, C-Y; CLARY, BM. A comparison of antiangiogenic therapies for the prevention of liver metastases. **J Surgical Res**; v.131; p.97-104; 2006.

MOSCHOS, SJ; ODOUX, C; LAND, SR; AGARWALA, S; FRIEDLAND, D; VOLKER, KM; SIDOR, C; WONG, M; KIRKWOOD, JM. Endostatin plus interferon- α 2b therapy for metastatic melanoma: a novel combinantion of antiangiogenic and immunomodulatory agents. **Melanoma Res**; v.17(3); p.193-200; 2007.

MORI, K; ANDO, A; GEHLBACH, P; NESBITT, D; TAKAHASHI, K. GOLDSTEEN, D; PENN, M; CHEN, T; MELIA, M; Phipps, S; Moffat, D; Brazzell, K. Liao, G; Dixon, KH; Campochiaro, PA. Inhibiiton of choroidal neovascularization by intravenous injections of adenoviral vectors epressing secretable endostatin. **Am J Pathol**; v.159; p313-320; 2001.

MORGAN, DA; RUSCETTI, FW; GALLO, RC. Slective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bne marrows. **Sci**; v.193; p.1007-1008; 1976.

MURPHY, KM; HEIMBERGER, AB; LOH, DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+ CD8+ TCRlo thymocytes in vivo. **Sci**; v.250(4988); p.1720-1723; 1990.

NAGASHIMA, S; MAILLIARD, R; KASHII, Y; REICHERT, TE; HERBERMAN, RB; ROBBINS, P; WHITESIDE, TL. Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization in vitro and in vivo. **Blood**; v.91; p.3850-3861; 1998.

NARAJO-GOMEZ, M; OLIVA, H; CLIMENT, N; FERNANDEZ, MA; RUIZ-RIOL, M; BOFILL, M; GATELL, JM; GALLART, T; PUJOL-BORRELL, R; BORRAS, FE. Expression and fuction of the IL-2 receptor in activated human plasmacytoid dendritic cells. **Eur J Immunol**; v.37; p.1764-1772; 2007.

NELSON, BH. IL-2, regulatory T cells and tolerance. **J Immun**; v.172; p.3983-3988; 2004.

O'REILLY, MS, BOEHM, T; SHING, Y; FUKAI, N; VASIOS, G; LANE, WS; FLYNN, E; BIRKHEAD, JR; OLSEN, BR; FOLKMAN, J. Endostatin – na endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**; v.88; p.277-285; 1997.

OLEJNICZAK, K e KASPRZAK, A. Biological properties of interleukin-2 and its role in pathogenesis of selected diseases – a review. **Med Sci Monit**; v.14(10); p.179-189; 2008.

OLSSON, AK; JOHANSSON, I; AKERUD, H; EINARSSON, B; CHRISTOFFERSON, R; SASAKI, T; TIMPE, R; CLAEISSON-WESH, L. The minimal active domain of endostatin is a heparin-binding motif that mediated inhibition of tumor vascularization. **Cancer Res**; v.64; p.9012-9017; 2004.

ORTEGA, N e WERB, Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. **J Cell Sci**; v.115; p.4201-4214; 2002.

PAVONE, L; ANDRULLI, S; SANTI, R; MAJORI, M; BUZIO, C. Long-term treatment with low doses of interleukin-2 and interferon-alpha: immunological effects in advanced renal cell cancer. **Cancer Immunol Immunother**; v.50(2); p.82-85; 2001.

PEINNEQUIN, A; MOURET, C; BIROT, O; ALONSO, A; MATHIEU, J; CLARENÇON, D; AGAY, D; CHANCERELLE, Y; MULTON, E. Rat proinflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. **BMC Imm**; v.5(3); p.1-10; 2004.

PEIRSON, SN; BUTLER, JN; FOSTER, RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to qualitative real-time PCR data analysis. **Nucl Acids Res**; v.31(14); p.1-7; 2003.

PFUTZNER, W. Retroviral Bicistronic vectors. **Drug News Perspect**; v.21(9); p.473-480; 2008.

RINI, BI; CAMPBELL, SC; ESCUDIER, B. Renal cell carcinoma. **Lancet**; v.28(373); p.1119-1132; 2009.

ROBBINS, PD e CHIVIZZANI, SC. Viral vectors for gene therapy. **Pharmacol Ther**; v.80(1); p.35-47; 1998.

RODRIGUES, T; CARRONDO, MJT; ALVES, PM; CRUZ, PE. Purification of retroviral vectors for clinical application: biological implications and technological challenges. **J Biotec**; v.127; p.520-541; 2007.

ROMAGNANI, S; GIUDIZI, GM; MAGGI, E; ALMERIGOGNA, F; BIAGIOTTI, R; DEL PRETE, G; MAZZETTI, M; ALESSI, A; VERCELLI, D; RICCI, M. Synergy of

B cell growth factor and interleukin-2 in the proliferation of activated human B cells. **Eur J Immunol**; v.15(12); p.1158-1164; 1985.

ROMANO, G. Advances and perspectives in the field of gene transfer technology. **Drug News Perspect**; v.19(6); p.359-368; 2006.

SAMBROOK, J e RUSSEL, DW – Molecular Cloning: a laboratory manual. Third Edition, 2001.

SAUTER, BV; MARTINET, O; ZHANG, W; MANDELI, J; WOO, LC. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. **Proc Natl Acad Sci USA**; v.97(9); p.4802-4807; 2000.

SETH, P. Vectro-mediated cancer gene therapy. **Cancer Biol Ther**; v.4(5); p.512-517; 2005.

SHI, H; HUANG, Y; ZHOU, H; SONG, X; YUAN, S; FU, Y; LUO, Y. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. **Blood**; v.110(8); p.2899-2906; 2007.

SHINOHARA, T; SUGIMOTO, Y; SATO, S; SONE, S; TSURUO, T. Combination therapy with antibody and interleukin-2 gene transfer against multidrug-resistant cancer cells. **Jpn J Cancer Res**; v.88; p.1100-1107; 1997.

SORENSEN, DR e READ, T-A. Delivery of endostatin in experimental cancer therapy. **Inter J Exp Pathol**; v.83; p.265-274; 2002.

STAGG, J; WU, JH; BOUGANIM, N; GALIPEAU, J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion cDNA for cancer gene immunotherapy. **Cancer Res**; v.64; p.8795-8799; 2004.

SUN, Y; WANG, J; LIU, Y; SONG, X; ZHANG, Y; LI, K; ZHI, X; ZHOU, Q; YOU, L; YAO, C. Results of phase III trial of rh-endostatin (YH-16) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. **J Clin Oncol**; v.23; p.654; 2005.

SUTLU, T e ALICI, E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. **J Inter Med**; v.266; p.154-181; 2009.

TANIGUCHI, T; MATSUI, H; FUJITA, T; TAKAOKA, C; KASHIMA, N; YOSHIMOTO, R; HAMURO, J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. **Nature**; v.302(5906); p.305-310; 1983.

THOMAS, JP; ARZOOMANIA, RZ; ALBERTI, D; MARNOKHA, R; LEE, F; FRIEDL, A; TUTSCH, K; DRESEN, A; GEIGER, P; PLUDA, J; FOLGER, W; SCHILLER, JH; WILDING, G. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. **J Clin Oncol**; v.21; p.223-231; 2003.

TRUDEL, S; TRACHTENBERG, J; TOI, A; SWEET, J; LI, ZH; JEWETT, M; TSHILIAS, J; ZHUANG, LH; HITT, M; WAN, Y; GAULDIE, J; GRAHAM, FL; DANCEY, J; STEWART, AK. A phase I trial of adenovector-mediated delivery of interleukin-2 (AsIL-2) in high-risk localized prostate cancer. *Cancer Gene Ther*; v.10; p.755-763; 2003.

TSUCHIYAMA, T; NAKAMOTO, Y; SAKAI, Y; MARUKAWA, Y; KITAHARA, M; MUKAIDA, N; KANEKO, S. Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J Immunol*; v.178; p.574-583; 2006.

VERMA, IM e SOMIA, N. Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature*; v.389; p.239-242; 1997.

VOGELZANG, NJ e STADLER, WM. Kidney Cancer. *Lancet*; v.352(9141); p.1691-1696; 1998.

WANG, X; LIU, F-K; LI, X; LI, J-S; XU, G-X. Retrovirus-mediated gene transfer of human endostatin inhibits growth of human liver carcinoma cells SMMC7721 in nude mice. *World J Gastroenterol*; v.8(6); p.1045-1049; 2002.

WANG, Y; YER, M; ANNALA, AJ; CHAMPPEL, S; MAURO, V; GAMBHIR, S. Noninvasive monitoring of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals using improved bicistronic vectors. *J Nucl Med*; v.46; p.667-674; 2005.

YANG, J; WONG, RK; WANG, X; MOIBI, J; HESSNER, MJ; GREENE, S; WU, J; SUKUMVANICH, S; WOLF, BA; GAO, Z. Leucine culture reveals that ATP synthase functions as a fuel sensor in pancreatic β cells. *J Biol Chem*; v.279; p.53915-53923; 2004.

YANG, AS e CHAPMAN, PB. The history and future of chemotherapy for melanoma. *Hematol Oncol Clin N Am*; v.23; p.583-597; 2009.

YAO, S; SUKONNIK, T; KEAN, T; BHARADWAJ, RR; PASCERI, P; ELLIS, J. Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther*; v.10(1); p.27-36; 2004.

YIN, G; LIU, W; AN, P; LI, P; DING, I; PLANELLES, V; SCHWARZ, EM; MIN, W. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther*; v.5; p.547-554; 2002.

YOON, SS; ETO, H; LIN, CM; NAKAMURA, H; PAWLIK, TM; SONG, SU; TANABE, KK. Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastase. *Cancer Res*; v.59(24); p.6251-6256; 1999.

XU, H; TAN, H; WANG, F; TANG, W. Research advances of endostatin and its short internal fragments. *Curr Protein Peptide Sci*; v.9; p.275-283; 2008.

ZHANG, JH; WAN, MX; PAN, BR; YU, B. Cytotoxicity of HSVtk and hr TNF- α fusion genes with IRES in treatment of gastric cancer. **Cancer Biol Th**; v.3(11); p.1075-1080; 2004.

ZHUANG, HQ e YUAN, ZY. Process in the mechanisms of endostatin combined with radiotherapy. **Cancer let**; v.282(1); p.9-13; 2009.