ALINE HUNGER RIBEIRO

**TRANSFERÊNCIA GÊNICA DE P19^{Arf} E INTERFERON-B EM CÉLULAS DE
MELANOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2011

ALINE HUNGER RIBEIRO

**TRANSFERÊNCIA GÊNICA DE P19^{Arf} E INTERFERON-B EM CÉLULAS DE
MELANOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Bryan Eric Strauss

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ribeiro, Aline Hunger.

Transferência gênica de p19^{Arf} e interferon- β em células de melanoma. / Aline Hunger Ribeiro. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Bryan Eric Strauss.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia Molecular.

Versão do título para o inglês: Gene transfer of p19^{Arf} and interferon- β in melanoma cells.

Descritores: 1. Transferência de genes 2. Melanoma 3. Adenovírus 4. Interferon Tipo I 5. Metástase neoplásica 6. Câncer I. Strauss, Bryan Eric II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0139/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Aline Hunger Ribeiro.

Título da Dissertação: Transferência gênica de p19^{Arf} e interferon- β em células de melanoma.

Orientador(a): Bryan Eric Strauss.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Dedico esse trabalho aos meus familiares, em especial à minha mãe Maura Lia Studart Hunger e às minhas avós Maria Décima Valdissera Ribeiro e Maria Lia Studart Hunger.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, à Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

Agradeço também ao meu orientador, prof. Dr. Bryan Eric Strauss, pela oportunidade concedida, confiança depositada, ideias e ensinamentos, sem o qual esse trabalho não seria possível. Obrigada a todos os professores, alunos e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Incor, especialmente ao prof. Dr. José Eduardo Krieger.

Agradeço também ao prof. Dr. Roger Chammas e aos alunos do Grupo de Adesão Celular e Câncer da Faculdade de Medicina da USP.

Aos integrantes do Laboratório de Vetores Virais sou extremamente grata, pelo apoio, ajuda, carinho e amizade. Aos velhos e novos amigos que me apoiaram e estiveram presentes nessa etapa de minha vida, agradeço enormemente. Obrigada Daniela Zanatta, Rafael Soares, Anna Carolina de Carvalho, Taynah Picolo, João Paulo Catani, Ruan Medrano, Christian Merkel, Márcio Bajgelman, Chester Bittencourt, Ana Laura de Barros, Elise Albejante, Talitha Kievitsbosch, Ana Maria Vasconcelos, Rubia Gaissler, Guilherme Roberto, Luís Massaro Júnior, Lucas Bandeira, Maria Fernanda Bittencourt, Andréia de Matos, Maria Eduarda Silva, Wendy Peeters e Isabela Schirato.

Por fim, agradeço de todo o coração à minha família, por todo o amor e apoio imprescindíveis. À minha mãe, Maura Lia, à minha irmã Bruna, às minhas avós, Maria Lia e Maria Décima, aos meus avôs, Arnoldo e José, aos meus tios e tias, Cinthia, Mônica, Marilu, Arnoldo, Marcelo, Djamshid, Pietro e Luciana, aos meus primos e primas, Adriana, Juliana, Carolina, Daniela, Pietro, Renato, Paulo e Keyvan, obrigada!

RESUMO

Ribeiro AH. Transferência gênica de p19^{Arf} e interferon- β em células de melanoma [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

O melanoma maligno é uma forma de câncer com alto índice de morte devido, em parte, à falta de tratamentos eficazes e à sua tendência de formar metástases. Nosso grupo tem desenvolvido vetores virais para a transferência gênica de fatores anti-tumorais e, inicialmente, foi construído um vetor adenoviral, AdPG, no qual a expressão do transgene é controlada por p53, um supressor de tumor e fator de transcrição. Sendo que aproximadamente 90% dos casos de melanoma retêm p53 selvagem, foi proposto que isto pudesse ser utilizado como uma ferramenta para dirigir a expressão do transgene codificado pelo vetor AdPG, um mecanismo apoiado por resultados anteriores de nosso grupo. Por exemplo, a transdução de células B16 (melanoma de camundongo, p53-selvagem, deleção de p19^{Arf}) com vetores AdPG portadores de p19^{Arf} ou interferon- β (IFN β) resultou em morte celular maciça enquanto a transferência de apenas um destes fatores isolados não causou o mesmo efeito. O trabalho descrito aqui inclui dois avanços tecnológicos críticos em comparação com trabalhos anteriores do grupo. Primeiramente, os transgenes de interesse (eGFP, p19^{Arf} e IFN β) foram inseridos num vetor adenoviral que apresenta o tripetídeo RGD na sua proteína fibra. Essa modificação no vetor permite a eficiente transdução de um amplo espectro de células alvos sem a dependência do receptor viral do adenovírus selvagem, CAR. Além disso, foi construído um vetor bicistrônico, que contém a combinação de ambos os genes terapêuticos, como forma de garantir a transferência dos dois fatores ao mesmo tempo para as células-alvo. A inclusão de p19^{Arf}, um supressor de tumor e inibidor de MDM2, como um gene terapêutico deve complementar as atividades do p53 celular endógeno e, como consequência, atuar na promoção da expressão a partir do vetor e também na inibição da proliferação das células tumorais. Porém, a transferência de p19^{Arf} sozinho acarretaria efeito somente nas células que foram transduzidas e, então, seu efeito seria limitado. Por este motivo, descreve-se, além do p19^{Arf}, a utilização de IFN β , uma proteína secretada com funções anti-tumorais, incluindo inibição de angiogênese, indução de apoptose e ativação da resposta imunológica. A estratégia do projeto contemplou vários níveis relacionados ao mecanismo do processo de transferência, incluindo a eficiência da transdução, o mecanismo de controle da expressão dos transgenes e as atividades dos transgenes. Assim, foi proposto que a combinação de p19^{Arf} e IFN β pudesse ser uma estratégia interessante para induzir morte

no tumor primário e uma resposta imunológica contra as células metastáticas. Com este projeto, foi iniciada a construção destes novos vetores aprimorados para transferência gênica nas células de melanoma.

Palavras-chave: Transferência de genes. Melanoma. Adenovírus. Interferon tipo I. Metástase neoplásica. Câncer.

ABSTRACT

Ribeiro AH. Gene transfer of p19^{Arf} and interferon- β in melanoma cells. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Malignant melanoma is a type of cancer with high death rates, in part, because of a lack of efficient treatments and its tendency to generate metastases. Our group has developed viral vectors for the gene transfer of anticancer factors and, initially, we constructed an adenoviral vector, AdPG, in which transgene expression is controlled by p53, a tumor suppressor and transcription factor. As 90% of melanoma cases maintain wild-type p53, it was proposed that this could be used as a tool to drive transgene expression encoded by the AdPG vector, as evidenced by previous studies from our group. For example, transduction of B16 cells (mouse melanoma, wild-type p53, p19^{Arf}-null) with vectors encoding p19^{Arf} or interferon- β (IFN β) resulted in massive death cell, while transfer of just one of these factors alone did not cause the same effect. The work described here includes two critical technologic advances in comparison with our previous work. First, transgenes of interest (eGFP, p19^{Arf} and IFN β) were inserted into an adenoviral vector which presents the RGD tripeptide in its fiber. This vector modification allows efficient transduction in a wide range of target cells without dependence on the wild type adenovirus receptor, CAR. In addition, a bicistronic vector was constructed which contains the combination of both therapeutic genes, ensuring the transfer of both factors to the target cells at the same time. Use of p19^{Arf}, a tumor suppressor and MDM2 inhibitor, as a therapeutic gene should complement endogenous p53 activities and, as a consequence, promote expression from the AdPG vector and inhibit tumor cell proliferation. However, p19^{Arf} gene transfer alone should have an effect only in transduced cells and, therefore, its effect would be limited. For this reason, we describe, in addition to p19^{Arf}, the application of IFN β , a secreted protein with antitumor functions, including inhibition of angiogenesis, induction of apoptosis and activation of immunologic response. This strategy involves several mechanistic levels related with the gene transfer process, including transduction efficiency, control over transgene expression and transgene activity. Therefore, it was proposed that the combination of p19^{Arf} and IFN β could be an interesting strategy to induce primary tumor death and an immunologic response against metastatic cells. In this project, the construction of new vectors optimized for gene transfer in melanoma cells was initiated.

Key words: Gene transfer. Melanoma. Adenovirus. Type I interferon. Neoplasm metastasis. Cancer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O melanoma e a terapia gênica	12
1.2 A via ARF-MDM2-p53 como alvo de inibição tumoral	13
<i>1.2.1 A ação de p53 como fator de transcrição.....</i>	<i>13</i>
1.3 Interferon-β (INFβ) como gene candidato para terapia gênica de melanoma.....	18
1.4 Interação entre p53 e INFβ como possível benefício para o tratamento de câncer....	21
1.5 Desenvolvimento de vetores adenovirais para transferência gênica	21
1.6 Linha de pesquisa do Laboratório de Vetores Virais.....	25
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Clonagem.....	28
<i>3.1.1 pENTR-PG-INFβ^{IRES}p19^{Arf}</i>	<i>29</i>
<i>3.1.2 pShuttle-promoterless-DEST</i>	<i>30</i>
<i>3.1.3 pAdRGD-promoterless-DEST</i>	<i>31</i>
<i>3.1.4 pShuttle-DEST.....</i>	<i>31</i>
<i>3.1.5 pAdRGD-CMV-DEST</i>	<i>31</i>
3.2 Construção dos vetores via recombinação sítio-específica	32
<i>3.2.1 pAdRGD-PG-INFβ.....</i>	<i>32</i>
<i>3.2.2 pAdRGD-PG-p19^{Arf}</i>	<i>32</i>
<i>3.2.3 pAdRGD-PG-INFβ^{IRES}p19^{Arf}</i>	<i>33</i>
<i>3.2.4 pAdRGD-PGeGFP.....</i>	<i>33</i>
<i>3.2.5 pAdRGD-PG-luc</i>	<i>33</i>
<i>3.2.6 pAdRGD-CMV-luc</i>	<i>33</i>
<i>3.2.7 pAdRGD-PG-p53</i>	<i>33</i>
3.3 Reação de PCR	33
3.4 Manutenção das linhagens celulares.....	34
3.5 Produção adenoviral	34
<i>3.5.1 Amplificação do título viral</i>	<i>34</i>
<i>3.5.2 Produção viral em larga escala</i>	<i>35</i>
<i>3.5.3 Purificação do lisado viral bruto.....</i>	<i>35</i>
3.6 Citometria de fluxo para detecção da expressão de eGFP.....	36
3.7 Imunofluorescência (IMF) para detecção de p19^{Arf}	36
3.8 Ensaio de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) para detecção de INFβ...	37
3.9 Ensaio de ciclo celular	37
4 RESULTADOS	39

4.1 Construção dos vetores pENTR	39
4.2 Construção do vetor AdRGD-DEST	43
4.3 Montagem dos vetores plasmidiais via recombinação sítio-específica	50
4.4 Caracterização funcional dos adenovírus em cultura de células	55
<i>4.4.1 Citometria de fluxo para detecção da expressão de eGFP</i>	<i>55</i>
<i>4.4.2 IMF para a detecção da expressão de p19^{Arf}</i>	<i>57</i>
<i>4.4.3 ELISA para a detecção da expressão de IFNβ.....</i>	<i>58</i>
<i>4.4.4 Ensaio de ciclo celular.....</i>	<i>58</i>
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 O melanoma e a terapia gênica

O melanoma é um tipo de câncer de origem neuroectodérmica, mais especificamente proveniente dos melanócitos (células produtoras de melanina), e que pode ser do tipo benigno ou maligno. Quando maligno, esse tumor se torna agressivo, mas ainda pode ser curado se excisado em um estágio precoce. No entanto, uma vez disseminado a órgãos distantes, a média de sobrevida dos pacientes com melanoma cai abaixo de nove meses (Gogas et al., 2007). Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase (Instituto Nacional de Câncer, 1996).

Nas últimas décadas, a incidência de melanoma vem crescendo mundialmente e a mortalidade pela doença tem permanecido alta. Sendo assim, o uso de uma terapia que agregue o combate ao melanoma primário e possíveis metástases levaria a um aumento significativo da sobrevida dos pacientes, justificando a utilização da resposta imunológica mediada por IFN β no tratamento, já que uma de suas funções é a ativação da resposta adaptativa do sistema imune, podendo assim inibir o desenvolvimento posterior das metástases (Alizadeh et al., 2003). Na clínica, explorar as diferenças entre células normais e tumorais guiaram os princípios da quimioterapia. Entretanto, selecionar a morte de células tumorais é difícil, pois muitos quimioterápicos atingem tanto células normais em divisão quanto células tumorais. A tentativa de encontrar meios de aumentar a especificidade de drogas para células tumorais é dificultada pelos vários *background* genéticos dos diferentes tumores (Lane et al., 2010).

Mutações no gene de p53 foram detectadas em 50% dos cânceres humanos e em quase todos os carcinomas de pele. A maioria dos carcinomas possui mutações, onde ocorre a alteração de um aminoácido produzindo a proteína completa, porém com sua função alterada. A análise de mutações no gene p53 estabeleceu uma conexão entre exposições à radiação ultravioleta (UV), dano ao DNA e carcinogênese de pele, e outros trabalhos já mostraram que p53 tem um importante papel na proteção celular contra danos ao DNA causados por exposição à UV (Benjamin e Ananthaswamy, 2007). Porém, no caso de melanoma, p53 se encontra mutado em somente 10% dos casos (Giglia-Mari e Sarasin, 2003). Para os tumores que retêm p53 selvagem, a manutenção do fenótipo tumoral depende da sua habilidade em

manter a p53 em uma forma inativa por um tempo além dos eventos de transformação inicial do tumor (Kastan, 2007; Martins et al., 2006; Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007).

Atingir a via de p53 no tratamento de melanoma talvez seja interessante por vários motivos. O p53 é um dos genes supressores de tumor mais comumente mutado em neoplasias (Hollstein et al., 1994; Olivier et al., 2010) e, mesmo quando mantido na sua forma selvagem no tumor, a proteína permanece em um estado não funcional (Perry, 2010). Dessa forma, seria interessante remediar o p53 diretamente (por transferência gênica do cDNA do p53 selvagem) ou através da reativação do p53 já presente na célula (por uso de drogas ou transferência gênica de fatores que ativam p53) (Lane et al., 2010). Normalmente, há pouca proteína p53 na célula, mas em resposta ao dano por UV, altos níveis de p53 são induzidos. Os altos níveis da p53 acarretam uma parada do ciclo celular em G1, permitindo à via de reparação celular remover as lesões causadas antes da síntese de DNA e mitose, ou promover um aumento da apoptose. No melanoma, somente 10% dos casos apresentam p53 mutado (Giglia-Mari e Sarasin, 2003), entretanto, mesmo que as células de melanoma apresentem p53 endógeno, este está inativo (Benjamin e Ananthaswamy, 2007; Lane, 1992; Levine, 1997). Foi observado em nossos estudos que tratar as células de melanoma repondo o p53 na sua forma selvagem não foi satisfatório (dados não publicados). Alternativamente, aproveitando-se do fato de que o melanoma apresenta p53, é possível utilizar radiação, uma droga ou outro gene que ative o p53 endógeno. Dados da literatura indicam que IFN β exerce sua função, em parte, através da ativação da via de p53 (Takaoka et al., 2003) ou p14^{ARF} (Sandoval et al., 2004). Por estes motivos, temos interesse em explorar as possíveis interações entre IFN β e a via de p53.

1.2 A proteína p53 e sua atuação na célula

1.2.1 A ação de p53 como fator de transcrição

Como um fator de transcrição, p53 inicia programas transcricionais que cessam a proliferação e previnem a geração de células geneticamente alteradas. Não surpreendentemente, defeitos na via de p53 levam ao desenvolvimento tumoral e são encontrados na maioria dos pacientes com cânceres, tanto como mutações do tipo *missense* no próprio p53 ou, alternativamente, em genes codificantes de outros componentes da via de p53 (Stiewe, 2007; Vousden e Lane, 2007). A p53 é fator transcricional de vários genes ligados ao ciclo celular (tais como p21 (WAF1), 14-3-3, GADD45 e B99), genes pró-apoptóticos (Bax, Fas/APO1, Killer/DR5, PIGs, p85, PAG608, IGF-Bp3) e genes ligados à inibição da

angiogênese (Tsp1, BAI1, GD-AiF) (el-Deiry, 1998). Juntamente com a função pró-apoptótica não-nuclear da p53 no citoplasma e na mitocôndria, esses genes promovem permeabilização da membrana exterior da mitocôndria e liberação do citocromo c, levando à ativação de caspases e à apoptose (Chipuk e Green, 2006). Além disso, p53 age também como inibidora de transcrição de uma variedade de promotores, incluindo genes que bloqueiam a apoptose, como Bcl-2 (Miyashita et al., 1994), e genes que proporcionam resistência a drogas quimioterápicas, como o *multidrug resistance gene*, MDR1 (Strauss et al., 1995).

A p53 possui as características clássicas de um ativador transcricional sequência-específico, incluindo um domínio de transativação na porção N-terminal, uma região central de ligação ao DNA, e um domínio de tetramerização na porção C-terminal. Dependendo da gama de genes ativados por p53 sob uma determinada condição, o resultado pode ser uma parada transiente do ciclo celular permitindo a reparação do dano no DNA, um bloqueio irreversível da proliferação causado por senescência ou diferenciação, ou morte celular via apoptose (Stiewe, 2007; Vousden e Lu, 2002).

A proteína p53 age como indutora de transcrição se ligando diretamente ao promotor de seus genes alvos. Um dos primeiros elementos responsivos à p53 identificados foi isolado do RGC (*Ribosomal Gene Cluster*) (Kern et al., 1991). Na sequência repórter PG13-CAT, 13 cópias do elemento PG (derivado do RGC) foram unidas a um promotor mínimo e ao cDNA da cloranfenicol acetil transferase (CAT), resultando em uma unidade regulatória muito sensível à p53 (Kern et al., 1992). A sequência geral reconhecida pela p53, PuPuPuCA/TA/TGPiPiPi (onde Pu=purina e Pi=pirimidina) foi definida logo depois (el-Deiry et al., 1992; Funk et al., 1992) e está presente no promotor de todos os genes ativados por essa proteína. Esta sequência PG, sendo responsiva à p53, foi utilizada como forma de induzir a transcrição dos transgenes abordados por esse projeto.

Mutações no gene p53 são as alterações mais comuns de câncer humano (Hollstein et al., 1994). Em geral, p53 mutado perde sua função como fator de transcrição, mas em alguns casos a proteína mutada pode ganhar novas funções, como promoção de proliferação celular ou ativação de genes não desejados (Dittmer et al., 1993; Hsiao et al., 1994; Strauss e Haas, 1995). A perda da atividade de p53 deixa a célula vulnerável à proliferação descontrolada e relativamente resistente à apoptose induzida por quimioterápicos ou radiação (Lowe e Ruley, 1993; Lowe et al., 1993a; Lowe et al., 1993b). Por estes motivos, a reposição de p53 como alvo terapêutico continua sendo uma esperança para o tratamento do câncer. Dentre os protocolos clínicos de terapia gênica, o p53 foi utilizado como gene terapêutico em 73 destes, como câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão de células não-pequenas, câncer de

mama e ovário, câncer colorretal, câncer cervical, câncer de tireóide, carcinoma de nasofaringe, tumor maligno oral e maxilofacial, câncer de bexiga, carcinoma hepatocelular, câncer de fígado, câncer de próstata, gliomas malignos, carcinoma pulmonar de células bronquioalveolares e síndrome de Li-Fraumeni. Entretanto, nenhum desses foi para o tratamento de melanoma (Gene therapy clinical trials worldwide, 2011).

1.2.2 A via de p53/MDM2/ARF como alvo de inibição tumoral

A p53 só age de forma relevante no ciclo celular no momento em que se torna estável e ativa em resposta a vários fatores de estresse, tais como dano ao DNA, hipóxia, deleção de nucleotídeos ou ativação de oncogenes (el-Deiry, 1998). A ativação de p53 em resposta ao dano no DNA é mediada via kinases, tais como ATM, ATR, DNA-PKcs (PRKDC), CHK1 e CHK2, que fosforilam p53 (Lakin e Jackson, 1999) em resíduos-chave, estabilizando p53 e potencializando a ligação de p53 ao DNA (Olsson et al., 2007).

Em uma célula normal sob condições estáveis, a proteína p53 é expressa em baixos níveis e possui uma baixa estabilidade na célula, graças à rápida degradação que ela sofre devido a sua ubiquitinação. A ubiquitina funciona como um sinal, se ligando a proteínas da célula e tornando-as alvos para os processos de degradação por proteassomo. A responsável pela ubiquitinação da p53 é conhecida como MDM2 que, dessa forma, regula o nível de p53 na célula (Haupt et al., 1997). A degradação de p53 mediada por MDM2 requer um sinal de degradação localizado entre os resíduos de aminoácido 92 e 112 da p53, e a deleção desses resíduos inibe significativamente a degradação de p53 por MDM2 (Kubo et al., 2010). Além disto, a MDM2 pode se ligar ao domínio de transativação da p53 impedindo que esta proteína interaja com a maquinaria transcricional da qual faz parte (Haupt et al., 1996).

Proteínas poliubiquitinadas são alvos clássicos para degradação pelo proteassomo 26S. Cadeias de ubiquitinas tornam alvos as proteínas para proteassomos (Deveraux et al., 1994; Lam et al., 2002) iniciando o processo de degradação (Groll e Huber, 2003). O proteassomo é uma protease celular composta de várias subunidades e que digere a maioria das proteínas que possuem meia-vida curta na célula. Ele é composto de uma subunidade catalítica 20S e, usualmente, uma ou duas subunidades regulatórias 19S (Goldberg, 2003). Para atividades específicas do proteassomo, a subunidade 19S pode ser substituída por outros complexos proteicos (Förster et al., 2005; Li e Deng, 2003). Essas subunidades regulatórias controlam a entrada de substratos proteicos na cavidade catalítica do centro 20S. Entretanto, deve-se notar que certas proteínas não ubiquitinadas podem ser degradadas pelo proteassomo, uma vez que

elas são direcionadas ao centro catalítico (Goldberg, 2003; Orlowski e Wilk, 2003; Sdek et al., 2005). Além disso, a poliubiquitinação de p53 não é suficiente para direcionar a degradação de p53. Quando o domínio central de MDM2 é deletado, ou quando resíduos fosforiláveis do domínio central são substituídos por resíduos não fosforiláveis (Argentini et al., 2001; Blattner et al., 2002; Grossman et al., 1998), a proteína p53 não é degradada embora esteja poliubiquitinada. Dessa forma, MDM2 possui atividades independentes de E3 que são necessárias para a degradação de p53.

A degradação de p53 ocorre na maioria das vezes no citoplasma. Entretanto, há outros relatos sugerindo que p53 pode também ser degradada no compartimento nuclear (Joseph e Moll, 2003; Joseph et al., 2003; Xirodimas et al., 2001). No entanto, apesar de muitos estudos, os sítios subcelulares de ubiquitinação e degradação de p53 ainda permanecem incertos.

É interessante observar que o fator de transcrição da MDM2 é a própria p53, caracterizando assim um controle do tipo *feedback* negativo. A ligação de MDM2 a p53 é desfeita após ocorrer dano ao DNA (Shieh et al., 1997), impedindo a regulação negativa de p53 por MDM2 e promovendo acúmulo da proteína p53. Recentemente, foi descoberto que MDM2 atua de duas formas na regulação da p53, acarretando aumento na expressão dessa proteína, bem como degradação dela (Yin et al., 2002).

A proteína MDM2 é uma molécula complexa e altamente regulada que contém além do domínio amino-terminal de ligação a p53, um domínio *zinc finger*, um domínio com atividade E3 ligase para ubiquitinação Nedd-8, e um domínio central ácido (Toledo e Wahl, 2007). Embora o domínio amino-terminal seja responsável pela interação com p53, outros sítios de interação com essa proteína já foram reportados (Shimizu et al., 2002) e MDM2 interaja com muitas outras proteínas incluindo outro membro da sua família, a MDMX. Isso sugere que outros sítios em MDM2 podem ser alvos de intervenção terapêutica e, de fato, a proteína supressora de tumor ARF atua ao menos em parte, se ligando ao domínio ácido de MDM2 e inibindo sua atividade como regulador negativo de p53 (Midgley et al., 2000).

A proteína ARF (p19^{Arf} nos murinos, e p14^{ARF} nos humanos) controla a MDM2 se ligando a ela e se opondo à atividade de MDM2. ARF é induzida em resposta a ativação de oncogenes (Kamijo et al., 1998; Zhang et al., 1998) como, por exemplo, oncogenes celulares e virais, tais como Ras e o gene adenoviral E1A e, conseqüentemente, ocasiona ativação de p53 (Sherr, 2006). ARF estabiliza a p53 promovendo a degradação de MDM2 (Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998) e também pode induzir apoptose de maneira independente de p53 (Tsuji et al., 2002). Uma vez que ARF se liga a um sítio em MDM2 (Bothner et al., 2001;

Weber et al., 2000) distinto daquele onde MDM2 se liga à p53 (Kussie et al., 1996) não interferindo assim na ligação de MDM2 à p53 (Kussie et al., 1996; Zhang et al., 1998), é possível que a superexpressão de ARF contribua para o acúmulo da proteína p53 direcionando MDM2 de sítios onde a proteína p53 está ativa, onde MDM2 promove degradação de p53, para sítios de síntese de p53, onde MDM2 causa aumento da tradução dessa proteína. p53, por sua vez, suprime o promotor de ARF (Robertson e Jones, 1998).

Em adição ao seu efeito em p53, ARF pode também ter funções supressoras de tumor independentes de p53, como indicado por vários estudos (Saadatmandi et al., 2002; Tsuji et al., 2002; Weber et al., 2000). Embora o mecanismo dessa função adicional não tenha sido elucidado, ele talvez envolva um ou mais parceiros de ligação ao ARF que não MDM2. Muitos desses têm sido identificados e incluem E2F-1 (Eymin et al., 2001), topoisomerase (Karayan et al., 2001), MDMX (Jackson et al., 2001) e CARF (Hasan et al., 2002).

Juntos, p53, MDM2 e ARF atuam em um *feedback* que mantém baixos níveis de expressão de p53 sob condições normais, mas também permite um rápido acúmulo de p53 em resposta a danos ao DNA ou ativação de oncogenes. Tendo em vista todo esse mecanismo de regulação p53/mdm2/Arf, podemos deduzir que ele representa um papel primordial no controle do ciclo celular e na indução de apoptose, sendo que possíveis falhas neste sistema podem ser grandes responsáveis pela gênese de tumores (Figura 1). Esta dedução se confirma em dados: falhas no p53 estão presentes em 50 a 60% dos cânceres humanos (Greenblatt et al., 1994; Hollstein et al., 1991); o gene MDM2 é amplificado em 30 a 40% dos sarcomas, sendo que na maioria dos casos o p53 desses sarcomas está intacto (Oliner et al., 1992) e em 56% dos casos de melanoma (Polsky et al., 2001); também a maioria dos tumores com p14^{ARF} mutado apresenta p53 tipo selvagem (Esteller et al., 2000; Pinyol et al., 2000), sendo que em 50% dos casos de melanoma, o *locus* CDKN2a onde reside o gene do p14^{ARF} (humano) é perdido (Sharpless e Chin, 2003).

Figura 1: Representação esquemática da interação em *feedback* entre ARF, MDM2 e p53 em células de melanoma, que, normalmente, apresentam deleção de ARF, amplificação do locus de MDM2 e mantêm a proteína p53 selvagem.

Transformações malignas sempre envolvem a desregulação de pontos restritos do ciclo celular. No entanto, eventos adicionais são necessários para o surgimento de um fenótipo maligno, devido ao fato de que sinais hiperproliferativos ativam um mecanismo de defesa que resulta na parada do ciclo celular, senescência ou apoptose. A maior efetora desse mecanismo é a via ARF-MDM2-p53 e, por isso, já que a célula de melanoma possui p53 endógeno, a utilização de ARF, ao invés de p53, na terapia gênica poderia ser mais bem explorada, visto que a ativação de ARF inibe a interação de MDM2 com p53, permitindo que p53 promova a parada da progressão celular e induza apoptose ou senescência (Sandoval et al., 2004).

1.3 Interferon- β (INF β) como gene candidato para terapia gênica de melanoma

Interferons (IFNs) são proteínas multifuncionais secretadas envolvidas na defesa antiviral, regulação do ciclo celular e ativação de imunidade. IFNs são classificados como α , β , ω , γ , de acordo com suas bases estruturais e propriedades antigênicas, e são agrupados em duas famílias: Tipo I e Tipo II. IFN α , β e ω pertencem à família do Tipo I e são produzidos pela maioria dos tipos celulares em resposta à infecção viral ou outro estímulo. IFN γ , o único que pertence à família Tipo II, é secretado por linfócitos T e células NK em resposta a mitógenos ou antígenos específicos (Porta et al., 2005).

A atividade do sistema IFN Tipo I pode causar morte celular e, por isso, necessita de controle preciso para evitar sua ativação inapropriada. Na ausência de infecção viral, células produzem pouco IFN β que, por isso, não se liga ao seu receptor e não ativa o sistema Jak-STAT. Na fase precoce após infecção viral, o IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) é modificado por fosforilação e se torna ativo induzindo a expressão de IFN β . Agora que IFN β está presente, ele se liga ao seu receptor (*Type-I interferon receptor*, IFNAR), inicia a transdução de sinal mediado pelo sistema Jak-STAT, e torna ativo o complexo ISGF3 (contendo stat-1 e stat-2 fosforilados e IRF-9). Por sua vez, ISGF3 ativa transcrição via elemento ISRE (*interferon stimulated response element*) presente no promotor de IRF-7. Na fase tardia após infecção viral, a indução forte de IRF-7 fosforilado coopera com IRF-3 fosforilado ativando transcricionalmente os genes de IFN α/β . Juntos, IFN β e IFN α ligam-se aos seus receptores e fortalecem o sistema de ativação de IFN via um mecanismo de *feedback* positivo (Figura 2). A ativação do sistema IFN resulta na expressão dos fatores mencionados acima e também na expressão de MHC, citocinas e fatores quimiotáticos. Estes fatores podem ativar o sistema imune via células T-CD4, T-CD8, proporcionar maturação de células dendríticas, acarretar na atração de macrófagos e induzir apoptose (Sato et al., 2001), além de

apresentarem propriedades antiangiogênicas (Brem et al., 1993). Dessa forma, IFN Tipo I têm mostrado ocasionar uma resposta antitumoral através do sistema imune (Kantarjian et al., 2006; Ravandi et al., 1999).

Early phase

Late phase

Figura 2: Representação esquemática do mecanismo bifásico para a indução do gene IFN α/β , mediada por IRF-3 e IRF-7

Fonte: Sato et al. (2001).

Proteínas recombinantes de IFN- α/β são usadas para o tratamento de algumas formas de câncer (Sato et al., 2001; Yoshida et al., 2004). IFN é considerado um fator importante na formação de glioma e melanoma devido à deleção frequente do *locus* contendo o grupo de genes de IFN em tumores humanos (James et al., 1991; Miyakoshi et al., 1990). Em meados de 1980, a proteína IFN β foi usada clinicamente, no Japão, como uma droga anticâncer e mostrou um claro efeito inibitório do crescimento de glioma e melanoma malignos (Yoshida et al., 2004). Atualmente, IFN recombinante é frequentemente utilizado como terapia coadjuvante de melanoma, no entanto, a eficácia é limitada devido à curta meia-vida da proteína, de aproximadamente 60 minutos, à ligação não-específica a outros tecidos além dos tumorais e à toxicidade associada com altas doses (Kavanagh et al., 2005; Sabel e Sondak, 2003). No Brasil, a cirurgia é o tratamento mais indicado para o melanoma. A radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas dependendo do estágio do câncer. Quando há metástase, o melanoma é incurável na maioria dos casos. A estratégia de tratamento para a doença avançada deve ter então como objetivo aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (INCA, 1996).

Para melhorar a terapia com IFNs tipo I, métodos de transferência gênica, tais como plasmídeos ou vetores virais (por exemplo, adenovírus), têm sido testados em modelos tumorais como os de câncer de pulmão, de próstata e gliomas (Cao et al., 2001; Natsume et al., 1999; Natsume et al., 2000; Sakurai et al., 2003). Ensaios laboratoriais demonstram a capacidade de IFN β em inibição tumoral e indução de memória imunológica. Por exemplo, um modelo experimental de fibrosarcoma foi tratado com adenovírus portador de IFN β e, como resultado, o tumor primário foi abolido. A reimplantação de células tumorais em animais previamente curados não resultou em formação de nenhum tumor, indicando a indução de imunidade contra este tipo celular (Lu et al., 1999). Em conjunto com apoptose, células de glioma transduzidas com o gene de IFN β , produzem interleucinas (IL)-1 β , IL-6, TNF (*tumor necrosis factor*), MPC-1 (*monocyte chemotactic protein*), IFN γ -inducible protein-10 (IP-10) e HSP (*heat shock protein*), além de IFN β . A transferência gênica de IFN β ativa respostas do sistema imune e facilita a imuno-infiltração celular (Yoshida et al., 2004). Utilizando um modelo de melanoma com células B16 (B16-F10/ATCC número CRL-6475) no camundongo C57BL/6, a metástase foi reduzida com tratamento gênico diretamente nos tumores primários ou com injeção sistêmica com um adenovírus (Alizadeh et al., 2003).

Embora IFNs tipo I têm mostrado um grande efeito antitumoral, quando transferidos por vetores virais, IFNs também podem induzir uma resposta imune severa contra o vetor em si.

Pelo menos seis protocolos clínicos de terapia gênica do câncer foram abordados utilizando IFN β como gene terapêutico (Gene therapy clinical trials worldwide, 2011). A transferência do gene de IFN β diretamente para células tumorais deverá oferecer um efeito localizado e evitar toxicidade pela proteína recombinante de IFN β . Ensaios mostraram que células resistentes ao tratamento com proteína recombinante foram sensíveis a tratamento gênico com IFN β (Yoshida et al., 2004).

Dessa forma, claramente, a noção de empregar IFN β como gene terapêutico está ganhando maior prestígio.

1.4 Interação entre p53 e IFN β como possível benefício para o tratamento de câncer

Recentemente, dados da literatura indicaram que existe interações funcionais entre as vias de p53 e IFN. Células tratadas com proteína recombinante IFN α ou IFN β respondem com um aumento do nível de proteína p53. Um elemento ISRE, responsivo a ISGF3, foi identificado no promotor do gene de p53, mostrando que a indução de p53 por IFN β é causada por ativação transcricional (Takaoka et al., 2003). Este caso é extremamente interessante, já que a ativação de p53 é tipicamente associada com modificação pós-traducional, e não com aumento de sua transcrição (Levine, 1997). Sobretudo, foi demonstrado que a apoptose de células tumorais tratadas com proteína recombinante IFN α ou IFN β foi aumentada na presença de p53 (Takaoka et al., 2003), demonstrando que o efeito pró-apoptótico de IFN envolve p53.

Em algumas linhagens celulares, o efeito citostático dos IFNs tipo I não requer p53 nem seu parceiro funcional p14^{ARF}; em outras linhagens celulares, a indução de apoptose requer p14^{ARF}, mas não p53 (Sandoval et al., 2004). Além disso, p53 ativa diretamente a expressão de IRF-5 (Mori et al., 2002), mas a função de IRF-5, um candidato supressor de tumor, não depende de p53 (Hu et al., 2005).

1.5 Desenvolvimento de vetores adenovirais para transferência gênica

Vetores virais são sistemas biológicos derivados de vírus naturais capazes de transferir seus materiais genéticos para as células hospedeiras. Muitos vírus incluindo retrovírus, adenovírus, vírus da herpes simples (HSV) e vírus adeno-associados (AAV) foram modificados para eliminar sua toxicidade e manter sua alta capacidade de transferência

gênica, entretanto mantendo diversas vantagens (Muzyczka, 1992) e, com isso, se tornando muito eficientes em transferir e expressar genes.

Protocolos clínicos de terapia gênica têm sido abordados durante os últimos 18 anos, predominantemente nos Estados Unidos e na Europa. Durante esta experiência, 392 protocolos foram elaborados utilizando adenovírus como vetor de transferência gênica, sendo 297 destes direcionados para tratamento de câncer e, especificamente, 25 protocolos para o tratamento de melanoma (Gene therapy clinical trials worldwide, 2011).

Vários são os motivos para se utilizar vetores recombinantes derivados do adenovírus (Ad) para transferência gênica: ele pode gerar altos títulos *in vitro* (em torno de 10×10^{12} partículas por mL), o que facilita sua utilização clínica; pode transduzir uma grande variedade de células de mamíferos; transduz células mitóticas e pós-mitóticas; causa baixa patogenicidade para humanos; possui uma grande fita dupla de DNA (suportando grandes inserções de até 7,5 kb); não integra seu DNA ao da célula hospedeira, não havendo risco de ativação ou inativação aleatória de genes; e possui um forte tropismo por células cancerosas, tornando-o assim um ótimo vetor para a terapia gênica de câncer (Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002; Russell, 2000). Uma vez que a transferência do gene utilizando o adenovírus é transiente, pois o DNA genômico não se integra permanentemente ao material genético da célula hospedeira, administrações repetidas dos vetores adenovirais são necessárias para a obtenção do resultado terapêutico esperado. No entanto, existe um problema com a estratégia de dosagens repetidas, já que a presença de anticorpos do hospedeiro contra o adenovírus reduz sua infectividade.

Os adenovírus possuem um genoma de DNA linear com fita dupla, de tamanhos que variam entre 30 e 40 kb, sendo que o Ad5 possui 35.935 pb. Este genoma é flanqueado, em suas extremidades direita e esquerda, por ITRs (*inverted terminal repeats*), que funcionam como origem de replicação. Próximo ao ITR esquerdo está o sinal de empacotamento, necessário para a internalização do genoma no capsídeo. As outras partes do genoma são divididas de acordo com a ordem de expressão no ciclo de infecção, sendo os expressos na fase inicial, antes da replicação do DNA viral, chamados de E e os na fase posterior de L (Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002; Russell, 2000).

Os genes E codificam proteínas que regulam a replicação viral, e são classificados de 1 a 4. A primeira região transcrita durante a infecção viral é a E1A, grande responsável pela replicação viral e regulação da transcrição. Em seguida, a região E1B produz proteínas que bloqueiam o mRNA do hospedeiro e estimula o transporte do mRNA adenoviral do núcleo para o citoplasma (Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002; Russell, 2000).

Os genes L, que iniciam sua transcrição depois da replicação do DNA viral, são responsáveis pela estrutura proteica da partícula viral. Dentre estas proteínas estão as responsáveis pelo reconhecimento entre o vírus e a célula. Proteínas virais chamadas *knob* se ligam ao receptor CAR (*coxsackie-adenovirus receptor*) na membrana celular, ativando assim outras proteínas de membrana chamadas integrinas $\alpha_v\beta$ que interagem com o *penton base* e possibilitam a internalização do vírus. Esta partícula viral entra na célula através de um endossomo, que posteriormente é lisado pela ação de proteínas do envoltório viral, liberando o vírus no citosol. O genoma do vírus é então liberado no núcleo, onde passa a transcrever, replicar e empacotar as novas partículas virais (Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002; Russell, 2000).

No entanto, vetores adenovirais recombinantes possuem deleções da região E1A e de parte da E1B. Tipicamente, estes vetores apresentam a região E1 deletada do nucleotídeo 1 ao 3533 e também deleções na região E3, uma vez que esta região não é essencial para a produção em cultura e é a responsável por gerar grande parte da resposta imune de células infectadas. A maneira utilizada para a produção de vírus utiliza uma estratégia de amplificação do estoque viral. Este processo começa com a transfecção da construção adenoviral em células que possuam E1. As células utilizadas em nosso laboratório são células embrionárias de rim humano (HEK293) que produzem E1, complementando vetores com deleção dessa região. Assim, Ad produzidos em HEK293 podem infectar outras células, mas não podem replicar se essas células não expressam E1. Os vírus derivados desta primeira etapa têm um título baixo, mas servem como semente para sua amplificação. Este estoque é utilizado para infectar células HEK293, permitindo sua replicação com uma eficiência maior. Repetindo este processo, permite-se um aumento no título e no volume de células utilizadas para produção do Ad (Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002; Russell, 2000).

Existem alguns problemas em se utilizar Ad, principalmente no que diz respeito a esse controle de replicação. É possível que ocorram Ad replicativo-competentes em uma população de Ad replicativo-deficientes. Isso pode ocorrer como resultado de um duplo *crossover* entre sequências homólogas presentes no Ad recombinante e no genoma da célula HEK293, devolvendo ao vetor adenoviral a sequência E1, e tornando-o replicante novamente. Outro problema que pode ser enfrentado na utilização de Ad é uma significativa resposta imune do hospedeiro quando utilizado *in vivo*, podendo gerar inflamação. Também existe a possibilidade do organismo infectado produzir anticorpos anti-Ad reduzindo a eficiência da transferência gênica (Roy-Chowdhury e Horwitz, 2002; Russell, 2000).

Um problema fundamental referente à aplicação de vetores adenovirais é sua dependência do receptor CAR (Figura 3). Na ausência de CAR, o vetor adenoviral transduz a célula alvo com baixa eficiência. Nosso grupo já confirmou que a linhagem B16 não apresenta o receptor CAR e não é permissiva à transdução com vetores adenovirais. Contornando esse problema, a expressão forçada de CAR nessas células resultou na capacidade de transdução com adenovírus (Merkel, 2008¹ dados não publicados). No entanto, pensando na aplicação *in vivo* do vetor adenoviral, seria extremamente ineficiente introduzir CAR na célula primeiramente para depois ser obtida uma capacidade maior de transdução com adenovírus.

Figura 3: Representação esquemática da ligação e internalização do adenovírus. CAR, *Coxsackievirus and adenovirus receptor*.

Fonte: Horwood et al. (2002).

Modificações nas proteínas do capsídeo adenoviral podem ser feitas para melhorar a transferência gênica, tanto pela adição de novos receptores para proteínas tumorais na superfície do vírus, como pela retirada de epítopos que são fortemente reconhecidos pelo sistema imune antes da infecção viral (Ulasov et al., 2007). No caso, a solução mais prática

¹ Merkel, C. São Paulo, 2008.

para aumentar a eficiência de transdução com vetores adenovirais envolve modificação do vetor em si de maneira que o vírus seja capaz de transduzir a célula alvo mesmo na ausência do CAR. Para isto, (Mizuguchi et al., 2001) modificou a proteína fibra (entre resíduos 546 e 547) do adenovírus inserindo o tripeptídeo RGD. Com esta modificação, o receptor do vírus passa a ser sulfato de heparina e proteínas integrinas contendo α_v , mas não CAR. Como integrinas e heparinas são essencialmente ubíquos, o novo vetor adenoviral ganha capacidade de transduzir um amplo espectro de células alvos (Mizuguchi et al., 2001).

1.6 Linha de pesquisa do Laboratório de Vetores Virais

Nosso grupo vem desenvolvendo um trabalho com constante empenho no desenvolvimento de vetores virais relevantes para o tratamento antitumoral. A estratégia fundamental que foi desenvolvida no SVV é o uso de um promotor responsivo à p53 para dirigir a expressão do transgene contido no vetor viral. Começando com vetores retrovirais, temos mostrado que o promotor responsivo à p53, denominado PG, oferece níveis de expressão que são até sete vezes maior do que visto com o vetor parental (não modificado) (Strauss e Costanzi-Strauss, 2004). Quando o cDNA para p53 foi inserido neste vetor, um mecanismo de retroalimentação positiva foi estabelecido, o que promove altos níveis de expressão do p53 e proporciona inibição de proliferação de células tumorais melhor do que visto com o vetor parental (Strauss et al., 2005). Também foi mostrado que o retrovírus com expressão responsiva à p53 poderia ser utilizado para a transferência do parceiro funcional do p53, o p19^{Arf}. Neste estudo foi constatado que p19^{Arf} exógeno poderia complementar a função de p53 endógeno e proporcionar inibição da proliferação (Merkel et al., 2010). O conceito do vetor com expressão controlada por p53 foi adaptado para vetores adenovirais. Para isto, foi construído um novo promotor responsivo à p53, denominado PGTx β (ou simplesmente PG) que foi inserido no vetor adenoviral, gerando os vetores AdPG. Foi mostrado que este promotor foi até cinco vezes mais forte do que o promotor do CMV e que podia ser ativado na presença de p53 funcional (Bajgelman e Strauss, 2008).

Recentemente, observamos que o vetor adenoviral tradicional, com a fibra nativa do sorotipo 5, foi extremamente ineficiente em transduzir células B16. Para resolver este problema, introduzimos um vetor retroviral que expressa o receptor adenoviral, CAR. Isto resultou em uma alta eficiência de transdução das células B16mCAR (melanoma murino, p53-selvagem, p19^{Arf} deficiente com expressão forçada do receptor adenoviral, CAR) com o vetor adenoviral sorotipo 5. Mas, este procedimento é inconveniente, não possui relevância

clínica e até pode inibir o potencial metastático de células B16 (Yamashita et al., 2007). No tratamento destas células, nosso grupo constatou uma significativa interação entre os genes interferon- β murino (mIFN β) e p19^{Arf} (gene murino equivalente ao p14^{ARF} humano). Durante estes estudos, células B16mCAR transduzidas com os vetores adenovirais AdPGp19^{Arf} e AdPGmIFN β entraram em apoptose dentro de um intervalo de 96 horas, enquanto que a ação isolada destes vetores não proporcionou efeito algum. Em ensaios *in vivo* preliminares, este efeito foi reproduzido e somente os animais com tumores tratados com a combinação p19^{Arf} e mIFN β revelaram redução no tamanho do tumor devido à morte celular (Merkel, 2008² dados não publicados).

Já que o procedimento para forçar a expressão de CAR é inconveniente, o grupo de Mizuguchi demonstrou que a transdução de células CAR-negativas pode ser realizada com vetores adenovirais contendo uma modificação na fibra (Mizuguchi et al., 2001), conforme mencionado anteriormente. Nós obtivemos o vetor AdRGD portador de cDNA de LacZ e confirmamos que este vetor é realmente capaz de transduzir células B16 eficientemente.

Além disso, a utilização de um vetor bicistrônico pode ser mais eficaz que a combinação de dois vetores portadores de apenas um gene cada, possivelmente porque o vetor bicistrônico assegura a entrada de ambos os genes nas células-alvo e evita uma possível interferência entre as atividades de dois promotores fortes. Por estes motivos, propusemos a montagem de novos vetores que combinam aprimoramento de transdução, aperfeiçoamento da sua expressão e uma combinação de transgenes que induz morte celular e, possivelmente, induza uma resposta imune antitumoral.

² Merkel, C. São Paulo, 2008.

2 OBJETIVOS

Neste projeto, planejamos a construção de ferramentas para introduzir e expressar os cDNAs de p19^{Arf} e IFN β em células de melanoma de camundongo, B16. O desafio principal a ser abordado foi tornar o vetor adenoviral mais eficiente para transdução destas células, possibilitando futuras abordagens com relação ao mecanismo de controle da expressão e a atividades dos transgenes.

2.1 Modificação do sistema AdRGD para ser compatível com o sistema Gateway

2.2 Recombinação sítio-específica para montar os vetores adenovirais AdRGD-PGp19^{Arf}, AdRGD-PGIFN β , e AdRGD-PGIFN β IRESp19^{Arf}

2.3 Ensaios como Western, Elisa e imunofluorescência para explorar a transferência gênica de p19^{Arf}, IFN β e sua combinação em células B16

2.4 Observação do ciclo celular por coloração com iodeto de propídeo de células B16 transduzidas

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem

As preparações de plasmídeos foram realizadas utilizando o kit comercial Qiagen EndoFree midi (Qiagen), seguindo as instruções do fornecedor. A concentração final de cada preparação foi determinada através de leitura espectrofotométrica a 260 e 280 nm.

As digestões realizadas para os passos de clonagem foram feitas utilizando 20 µg de DNA inicial, 20 U de enzima em um volume final de 60 µL, seguindo sempre as orientações de cada fabricante.

Quando necessário, o tratamento das sequências com T4 DNA polimerase foi realizado utilizando todo o DNA que havia sido digerido anteriormente com uma enzima de restrição específica. Além disso, para esse tratamento, utilizamos 3 U de T4 DNA polimerase, aproximadamente 0,15 mM de cada dNTP, tampão 1X e água para 60 µL finais. A reação durou 30 minutos a 37 °C.

A reação com fosfatase alcalina (CIAP), a fim de evitar que o vetor se religasse, foi feita utilizando 2/3 do vetor linearizado. Assim, pudemos usar o 1/3 restante como controle da reação. Para isso, adicionamos ao vetor linearizado 10 U de enzima CIAP, tampão 1X e água para 60 µL finais. A reação teve duração de 1 hora a 37 °C.

Quando necessária, a purificação do DNA foi realizada por extração de fenol:clorofórmio e precipitação com etanol. Para isso, adicionamos à solução de DNA um volume igual de fenol:clorofórmio, centrifugamos a amostra e coletamos o sobrenadante. Após, adicionamos ao sobrenadante 2X o volume de etanol 100% e um volume de 10% de NaOAc 3 M pH 5,2. A mistura foi então centrifugada e o sobrenadante descartado. Adicionamos ao pellet de DNA 200 µL de etanol 70%, centrifugamos e descartamos o sobrenadante novamente, secando o DNA, o qual foi após ressuspensionado em água ou TE 1X.

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1%, TAE 1X e brometo de etídeo (1 µg de brometo de etídeo por mL de gel de agarose 1%). Posteriormente, a visualização do DNA foi realizada por exposição à luz UV. Os géis foram fotografados para análise utilizando-se câmera digital COHU *High Performance CCD camera/Stratagene Eagle Eye II*.

Para o isolamento de bandas lineares, o produto das digestões foi corrido em gel de agarose 1% e a banda foi recortada e extraída do gel utilizando o kit comercial de extração de gel (Omega Bio-Tek).

Para as construções de cada vetor e etapas de clonagem utilizamos as técnicas de DNA recombinante conforme descrito por (Sambrook et al., 1989).

Para a reação de ligação usamos 200 ng de vetor, tratado ou não com CIAP, e uma relação de molaridade de 2 vezes mais inserto. Na primeira de 4 reações diferentes, utilizamos apenas o vetor linearizado, não tratado com CIAP, e água para 20 µL finais. Dessa forma, após a transformação em bactérias pudemos confirmar a eficácia da reação de digestão do vetor. Na segunda reação, utilizamos o mesmo vetor e 400 U da enzima T4 DNA ligase, além de tampão 1X e água para 20 µL finais. Com isso, tendo ocorrida de forma apropriada a digestão do vetor, com essa segunda reação confirmamos a atividade apropriada da T4 DNA ligase. Já na terceira reação passamos a utilizar o vetor tratado com CIAP juntamente com a enzima T4 DNA ligase, tampão 1X e água para 20 µL finais, a fim de confirmar a atividade da fosfatase alcalina. Finalmente, na quarta reação, utilizamos o vetor tratado com CIAP, o inserto de interesse, a enzima T4 DNA ligase, tampão 1X e água para 20 µL finais, para que, após a confirmação das reações anteriores, obtivéssemos os clones de interesse.

Para a clonagem e manutenção dos fragmentos de DNA obtidos, utilizamos a linhagem de *Escherichia coli* DH5α, DB3.1 ou XL-Gold. As células foram cultivadas em meio LB ou LB-ágar (Sambrook et al., 1989), contendo antibióticos apropriados, a 37 °C. A indução de competência de *Escherichia coli* para transformação por métodos químicos seguiu (Sambrook et al., 1989).

Todos os plasmídeos obtidos foram mantidos em TE 1X e estocados a -80 °C, ou em clones bacterianos estocados em glicerol a -80 °C.

3.1.1 pENTR-PG-IFNβ^{IREs}p19^{Arf}

A construção do vetor pENTR-PG-IFNβ^{IREs}p19^{Arf} se deu em duas etapas. Primeiramente utilizamos o vetor pENTR-PG-p19^{Arf} como molde para uma reação de PCR com os oligonucleotídeos p19-Nco-F e p19-Xho-R, os quais dirigem a amplificação do cDNA p19^{Arf} e contêm sítios para as enzimas de restrição *Nco* I e *Xho* I, respectivamente, gerando um produto de PCR que pudesse ser posteriormente digerido com tais enzimas.

Oligos utilizados:

p19-Nco-F: 5' tataccatgggtcgcaggttcttg 3'

p19-Xho-R: 5' taatctcgagctatgccgctcggtc 3'

O vetor pBS^{IREs}CAT, já existente em nosso laboratório, foi também digerido com as mesmas enzimas para a liberação da região CAT e para que nós pudessemos utilizar a

sequência restante pBS^{IRES}. Após a digestão, o vetor pBS^{IRES} foi tratado com fosfatase alcalina, isolado por eletroforese de gel de agarose 1% e, posteriormente, ligado ao produto de PCR p19^{Arf}, gerando o vetor pBS^{IRES}-p19^{Arf}, o qual foi mapeado por digestão com enzimas de restrição para confirmarmos sua identidade.

Numa segunda etapa, isolamos a sequência IRES-p19^{Arf} digerindo o novo vetor pBS^{IRES}-p19^{Arf} com as enzimas *Xba* I e *Xho* I e tornamos as extremidades dessa sequência *blunt* através de reação com a enzima T4 DNA polimerase. O vetor pENTR-PG-INFβ, também já existente em nosso laboratório, foi digerido com a enzima *Xho* I e também adquiriu extremidades *blunt* através de reação com a enzima T4 DNA polimerase. Em seguida, ambos, sequência IRES-p19^{Arf} e vetor pENTR-PG-INFβ, foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1%, ligados entre si e transformados em bactéria competente *E. coli* DH5α. Um clone com o inserto na posição correta foi nomeado pENTR-PG-INFβ^{IRES}-p19^{Arf}.

3.1.2 pShuttle-promoterless-DEST

Para a construção do vetor pAdRGD-promoterless-Dest, realizamos a construção de vetores intermediários. O primeiro vetor intermediário construído foi o pShuttle_parte 1, sendo que, para isso, digerimos o vetor pShuttle2 (Clontech) com as enzimas de restrição *Kpn* I e *Eco*RI, retirando toda a região entre 985 e 1127pb, a qual contém a região SV40 e polyA, além de um dos sítios para a enzima *Bgl* II, localizado na posição 1121pb. Após as digestões, o vetor foi tratado com T4 DNA polimerase para ganhar extremidades *blunt*, isolado por eletroforese de gel de agarose 1% e purificado com o kit de extração de gel para ser religado e transformado em bactéria competente *E. coli* DB3.1. Os clones pShuttle_parte 1 obtidos foram mapeados e confirmados.

Em uma segunda etapa, esse novo vetor pShuttle_parte1 foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Xba* I, para retirarmos a região compreendida entre 33 e 942pb, a qual contém o promotor CMV e parte do *Multiple Cloning Site* (MCS). Esse vetor foi tratado com T4 DNA polimerase, isolado por eletroforese de gel de agarose 1%, purificado com kit de extração de gel e religado para ser transformado em bactéria competente *E. coli* DB3.1. Assim, obtivemos o vetor pShuttle_parte 2, o qual foi mapeado e confirmado por digestão com enzimas de restrição.

Já em uma terceira etapa, digerimos o vetor pShuttle_parte 2 com a enzima *Not* I e o tratamos com fosfatase alcalina. Esse vetor e a sequência inserto Gateway, que já fora

digerida com *Not* I quando extraída do vetor pAAV-dest, foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com kit de extração de gel. Uma reação de ligação entre o vetor e o inserto foi realizada e transformada em bactéria *E. coli* DB3.1. O clone de interesse com o inserto na orientação correta foi isolado e nomeado pShuttle-Promoterless-DEST.

3.1.3 pAdRGD-promoterless-DEST

A sequência contendo os sítios de recombinação foi isolada do vetor pShuttle-DEST utilizando as enzimas *I-Ceu* I e *PI-Sce* I, extraída e purificada de gel de agarose 1% e inserida no vetor AdRGD previamente digerido com as mesmas enzimas. Esta estratégia segue a lógica do protocolo do kit Adeno-X (Clontech), que foi desenvolvido pelo próprio Dr. Mizuguchi. Um clone contendo a sequência de interesse foi isolado e denominado pAdRGD-Promoterless-DEST.

3.1.4 pShuttle-DEST

Em paralelo a essa construção, montamos também o vetor pShuttle-DEST sendo que, para isso, o vetor pShuttle 2 não sofreu nenhuma modificação antes de receber a sequência GateWay, a qual foi extraída do vetor pAAV-dest através de digestão com *Not* I, isolada por eletroforese em gel de agarose 1%, purificada com kit de extração de gel e inserida no vetor pShuttle 2, também digerido e extraído de gel de agarose 1% da mesma forma. O clone de interesse com o inserto na orientação correta foi isolado e mapeado.

3.1.5 pAdRGD-CMV-DEST

Com a construção do vetor pShuttle-DEST fomos capazes de montar o vetor pAdRGD-CMV-DEST, através da lógica do protocolo do kit Adeno-X (Clontech), sendo que a sequência contendo os sítios de recombinação, bem como o promotor CMV e a região poly A, foi retirada do vetor pShuttle-DEST através de digestão com as enzimas *I-Ceu* I e *PI-Sce* I, isolada e purificada de gel de agarose 1% e inserida no vetor AdRGD previamente digerido com as mesmas enzimas.

3.2 Construção dos vetores via recombinação sítio-específica

Os vetores de “entrada”, denominados pENTR, construídos de forma a possuir o gene de interesse com expressão dirigida pelo elemento PG responsivo à p53, foram recombinados com o vetor de “destino”, pAdRGD-Promoterless-DEST para gerar vetores adenovirais. Alternativamente, vetores pENTR contendo apenas o cDNA de interesse, foram recombinados com o vetor de “destino”, pAdRGD-CMV-DEST, originando vetores adenovirais nos quais a expressão do transgene é controlada por um promotor constitutivo, CMV. Para isto, 300 ng do vetor de “entrada” e 300 ng do vetor de “destino” foram incubados com 2 µL de Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) e TE 1X para 10 µL finais, a 25 °C durante 1 hora. Em seguida, adicionamos 1 µL de Proteinase K na reação, incubamos por mais 10 minutos a 37 °C e, posteriormente, a mistura foi eletroporada (200 Ohms, 25 µF, 2,5 kV) em bactérias da linhagem XL-Gold.

As bactérias eletroporadas foram ressuspensas em 900 µL de meio SOC e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após, 200 µL da mistura foram plaqueados em meio LB/amp (ampicilina a 50 µg/mL) e incubados a 37 °C por no mínimo 24 horas. Após este período, selecionamos de 24 a 30 colônias para que essas fossem expandidas individualmente em 5 mL de LB/amp por 16-18 horas a 37 °C, sob agitação de 300 rpm. Os plasmídeos foram recuperados através de mini-prep e analisados através mapeamento com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado por fotografia digital.

3.2.1 *pAdRGD-PG-IFN β*

O vetor pENTR-PG-IFN β , já existente em nosso laboratório, foi recombinado com o vetor pAdRGD-promoterless-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-PG-IFN β .

3.2.2 *pAdRGD-PG-p19^{Arf}*

O vetor pENTR-PG-p19^{Arf}, já existente em nosso laboratório, foi recombinado com o vetor pAdRGD-promoterless-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-PG-p19^{Arf}.

3.2.3 *pAdRGD-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf}*

O vetor pENTR-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf} foi recombinação com o vetor pAdRGD-promoterless-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf}.

3.2.4 *pAdRGD-PGeGFP*

O vetor pENTR-PGeGFP, já existente em nosso laboratório, foi recombinação com o vetor pAdRGD-promoterless-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-PGeGFP.

3.2.5 *pAdRGD-PG-luc*

O vetor pENTR-PG-luc, já existente em nosso laboratório, foi recombinação com o vetor pAdRGD-promoterless-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-PG-luc.

3.2.6 *pAdRGD-CMV-luc*

O vetor pENTR-luc, já existente em nosso laboratório, foi recombinação com o vetor pAdRGD-CMV-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-CMV-luc.

3.2.7 *pAdRGD-PG-p53*

O vetor pENTR-PG-p53, já existente em nosso laboratório, foi recombinação com o vetor pAdRGD-promoterless-DEST. Um clone de interesse com o cassete de expressão na posição correta foi mapeado e denominado pAdRGD-PG-p53.

3.3 Reação de PCR

Para a reação de PCR, utilizamos 100 ng de DNA inicial, 0,4 mM de cada dNTP, 2,5 U de Taq DNA Platinum (Invitrogen), 50 pMol de cada *primer*, tampão 1X, 3 mM MgCl₂, e

água para 25 µL finais. O ciclo para a amplificação foi realizado em termociclador PTC-200 *Peltier Thermal Cycler* (MJ Research) sob as seguintes condições: 95 °C por 4 minutos (desnaturação inicial), seguido de 35 repetições de 95 °C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

3.4 Manutenção das linhagens celulares

A linhagem transformada por adenovírus HEK293 (*human embryonic kidney 293*) foi cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO-BRL, *Grand Island, New York*, EUA) suplementado com 10% de BCS (*bovine calf serum*) *Hyclone Defined*, (*Hyclone, Logan Utah*, EUA), 50 µg/mL de gentamicina, 25 µg/mL de ampicilina e 2,5 µg/mL de fungizona (anfotericina B), sendo mantida a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A linhagem de melanoma murino B16F10 (B16, ATCC CRL-6475) foi cultivada como descrito acima, porém utilizando meio RPMI (Invitrogen, USA).

3.5 Produção adenoviral

3.5.1 Amplificação do título viral

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

A 1ª amplificação viral será feita através da transdução do lisado viral em 5×10^5 células HEK293 em placas 3,5 cm. As células permanecerão em cultura por aproximadamente 7 dias para que, após, os vírus sejam coletados através do método de congela-descongela. Esse processo será repetido em placa 6 cm contendo $7,5 \times 10^5$ células HEK293 (2ª amplificação) e depois passado para placas de 10 cm contendo $1,0 \times 10^6$ células (3ª amplificação em diante) até que seja observado o efeito citopático.

3.5.2 Produção viral em larga escala

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

3.5.3 Purificação do lisado viral bruto

Para a purificação, aplica-se o lisado viral bruto em um gradiente de iodixanol para ultracentrifugação. Esse gradiente consiste das seguintes soluções adicionadas cuidadosamente a tubos Beckman claros 14x89 mm (Cat. N° 344059), seguindo-se a ordem da solução mais concentrada, na parte inferior do tubo, para a solução menos concentrada, na parte superior: 0,5 mL de 54% (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 mL de 40% (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 mL de 25% (w/v) iodixanol em PBS 1X contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 mL de 15% (w/v) iodixanol em PBS contendo 1 M NaCl, 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl. Aplica-se

cuidadosamente o lisado viral bruto (aproximadamente 4 mL) em cima do gradiente e o tubo é então centrifugado a 35000 rpm usando um rotor sorvall swing bucket (Rotor Sorvall TH-G41) por 1 hora a 10 °C. Os adenovírus formam uma banda clara na interface das soluções de densidade de 25% e 40%. A banda será removida com uma seringa, perfurando o tubo um pouco abaixo desta para não perturbá-la, e inserida em colunas PD-10 desalting contendo resina SephadexTM G-25 (GE, Cat. N° 52-1308-00 BB). Antes de inserir a banda viral nas colunas, essas devem ser preparadas equilibrando-as com 25 mL de PBS 1X. Após inserir-se a banda viral na coluna, deve-se esperar que o líquido entre nela completamente antes de eluir o vírus purificado. Para a eluição do vírus, insere-se aos poucos PBS 1X na coluna e coleta-se o eluente. Dessa forma, quando o eluente passar a apresentar uma coloração esbranquiçada, deve-se coletá-lo e estocá-lo com 7% de glicerol a -80 °C. Esse estoque consiste da preparação viral purificada, a qual deve ser titulada com o kit Adeno-X Rapid Titer (Clontech, Cat. N° 632250) para ser utilizada nos ensaios.

3.6 Citometria de fluxo para detecção da expressão de eGFP

Células B16 e B16mCAR foram plaqueadas (3×10^5 células por poço em placa de 6 poços) e, 24 horas após, foram infectadas com um MOI (*multiplicity of infection*) de 25 de AdRGD-PG-eGFP, obtido com a última etapa de amplificação realizada (quando foi possível a observação do efeito citopático do vírus). As células foram então incubadas por 24 horas e, após, tratadas com 100 ng/mL de doxorrubicina por 16 horas. Posteriormente, estas foram tripsinizadas e fixadas com paraformaldeído 4% para serem analisadas utilizando-se citometria de fluxo (FACScalibur, Becton-Dickenson, CA, USA). Esse experimento foi repetido três vezes independentes.

3.7 Imunofluorescência (IMF) para detecção de p19^{Arf}

Células B16 foram semeadas em lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços com 5×10^4 células por poço. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas e, após, as células foram transduzidas com um MOI de 25 de AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-IFN β , AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β ^{IRIS}p19^{Arf} e com a combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β . As células foram preparadas para o ensaio de IMF 48 horas após a transdução.

No preparo para IMF, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com metanol 100% e lavadas novamente com PBS 1X. Em seguida, as células foram permeabilizadas com PBS 1X + nonidet p40 0,1%, por 30 minutos a 37 °C, lavadas com PBS 1X e bloqueadas com PBS 1X + albumina 1%, para evitar interação não específica do anticorpo, a 37 °C por 30 minutos. Após, as células foram lavadas com PBS 1X, incubadas com o anticorpo primário (policlonal anti p19^{Arf} produzido em coelho - Calbiochem) diluído em PBS 1X + albumina 1% por 1 hora a 25 °C, e lavadas com PBS 1X novamente. A incubação com o anticorpo secundário (IgG anti-coelho produzido em cabra conjugado com Alexa Fluor 488 - Invitrogen) diluído em PBS 1X se deu por 45 minutos a 25 °C. As células foram mais uma vez lavadas com PBS 1X seguindo-se incubação com Hoechst 33258 (20 µg/ml) por 30 minutos a 25 °C. Após a lavagem final com PBS 1X, as lamínulas foram montadas em lâminas com glicerol 50% e seladas com esmalte.

3.8 Ensaio de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) para detecção de IFN β

Para a detecção da expressão de IFN β pelos vetores virais, submetemos o meio de cultura, com o qual as células B16 foram cultivadas a 37 °C por 48 horas após a transdução com os vírus, ao ensaio de ELISA. Utilizamos para a transdução um MOI de 25 dos vírus AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , AdRGD-PG-IFN β^{IRES} -p19^{Arf} e da combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β . Utilizamos como controle, o meio de cultivo das células B16 que não foram transduzidas. O método da detecção por ELISA se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Os ensaios foram feitos segundo o protocolo do fabricante (PBL Biomedical) e a absorbância (450nm) foi determinada pelo leitor de microplacas VictorTm (Perkin-Elmer-EUA).

3.9 Ensaio de ciclo celular

Células B16 foram plaqueadas a 1×10^5 por poço em placa de 6 poços e foram incubadas a 37 °C por 24 horas sendo, após, transduzidas com um MOI de 50 dos vírus AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PGIFN β , AdRGD-PG-IFN β^{IRES} -p19^{Arf} e da combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PGIFN β .

As células aderidas na placa, bem como as células que entraram em suspensão pela ação dos vírus, foram coletadas após 24, 36, 48 e 60 horas da transdução, e foram fixadas em etanol 70% até serem analisadas. Para a análise, as células foram centrifugadas (4 °C por 5

minutos a 1000 rpm), lavadas com PBS 1X e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e as células tratadas com 0,5 mL de Iodeto de Propídeo (10 µg/µl) durante 30 minutos a 37 °C. Após este período, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 0,1 mL de PBS 1X. A fluorescência emitida pelo PI foi medida por meio do citômetro de fluxo (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA). O perfil do ciclo celular foi analisado pelo programa CellQuest (BD,CA).

4 RESULTADOS

4.1 Construção dos vetores pENTR

Tipicamente, a construção de vetores adenovirais requer a montagem de um vetor de “entrada” portador dos genes de interesse e, posteriormente, a inserção destas sequências no contexto do vetor adenoviral. No sistema adotado em nosso laboratório, o vetor de “entrada” se chama pENTR. Nós já possuíamos prontos os vetores pENTR contendo o promotor dirigido por p53 e portando os cDNAs para p19^{Arf} ou IFN β murino, além de vários controles de interesse, como eGFP e luciferase (Figura 4).

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 4: Vetores de transferência gênica pENTR-PG-p19^{Arf} (A), pENTR-PG-IFN β (B) pENTR-PGeGFP e (D) pENTR-PG-luc.

Para a construção de um vetor contendo a combinação dos cDNAs de interesse, pENTR-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf}, realizamos uma reação de PCR com os oligonucleotídeos p19-Nco-F e p19-Xho-R, dirigindo a amplificação do cDNA p19^{Arf}. A integridade do produto de PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 5) e, em seguida, o produto de PCR foi inserido no vetor pBS^{IRES}, derivado do vetor pBS^{IRES}CAT (Figura 6).

Figura 5: Foto de gel de agarose 1 % mostrando a amplificação do cDNA p19^{Arf} a partir do vetor pENTR-PG-p19^{Arf} e oligonucleotídeos p19-Nco-F e p19-Xho-R (canaleta 2) e o controle negativo da reação (canaleta 3). Na canaleta 1 está o padrão Padrão λ *Hind* III (NEB) para comparação.

Figura 6: Vetor pBS^{IRES}CAT.

O vetor resultante, pBS^{IRES}p19^{Arf} (Figura 7A), foi mapeado por digestão com enzimas de restrição para confirmarmos sua identidade. Nesse mapeamento, realizamos a digestão do vetor com as enzimas *Xba* I, *Xho* I, *Xba* I + *Xho* I e *Nco* I + *Xho* I e, dessa forma, esperávamos que as bandas liberadas com essas digestões fossem de 4,1 kb; 4,1 kb; 3,0 + 1,1 kb; e 3,6 + 0,5 kb respectivamente, o que pode ser observado com a Figura 7B.

(A)

(B)

Figura 7: (A) Vetor pBS^{IRES}p19^{Arf}. (B) Foto de gel de agarose 1 % mostrando o perfil de restrição do vetor pBS^{IRES}p19^{Arf}: Canaletas 1) Padrão de 1kb (Invitrogen); 2) Vetor pBS^{IRES}p19^{Arf} intacto; 3) Digestão do vetor pBS^{IRES}p19^{Arf} com a enzima *Xba* I (NEB); 4) Digestão do vetor pBS^{IRES}p19^{Arf} com *Xho* I (NEB); 5) Digestão do vetor pBS^{IRES}p19^{Arf} com *Xba* I e *Xho* I; 6) Digestão do vetor pBS^{IRES}p19^{Arf} com *Nco* I (Invitrogen) e *Xho* I.

Após, a sequência IRES p19^{Arf} e o vetor pENTR-PG-INFβ (Figura 4B) foram tratados para serem ligados e transformados em bactéria competente *E. coli* DH5α. Um clone com o inserto na posição correta foi nomeado pENTR-PG-INFβ^{IRES}p19^{Arf} (Figura 8A) e teve seu perfil de restrição mapeado com as enzimas *Eco* RI, *Bam* HI, *Nco* I e *Bam* HI + *Nco* I. Dessa forma obtivemos a Figura 8B, a qual mostra os fragmentos de DNA liberados com essas digestões: 3,3 + 1,0 + 0,8 kb; 5,2 kb; 3,2 + 2,0; e 3,2 + 1,4 + 0,6 kb respectivamente.

(A)

(B)

Figura 8: (A) Vetor pENTR-PGIFN β^{IRES} p19 Arf . (B) Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor pENTR-PGIFN β^{IRES} p19 Arf : Canaletas 1) Padrão de 1kb (Invitrogen); 2) Vetor pENTR-PGIFN β^{IRES} p19 Arf intacto; 3) Digestão do vetor pENTR-PGIFN β^{IRES} p19 Arf com *Eco* RI (Invitrogen); 4) Digestão do vetor pENTR-PGIFN β^{IRES} p19 Arf com *Bam* HI (NEB); 5) Digestão do vetor pENTR-PGIFN β^{IRES} p19 Arf com *Nco* I (Invitrogen); 6) Digestão do vetor pENTR-PGIFN β^{IRES} p19 Arf com *Bam* HI e *Nco* I.

4.2 Construção do vetor AdRGD-DEST

Utilizamos a estratégia do sistema Gateway da Invitrogen para a montagem dos nossos vetores adenovirais. Este sistema utiliza a recombinação sítio-específica para introduzir o cDNA de interesse no vetor escolhido. Para isto, o cDNA precisa ser montado no vetor de “entrada”, pENTR, que serve como doador do cDNA a ser inserido no vetor de “destino”. O cDNA no vetor de “entrada” está flanqueado por sequências para recombinação sítio-

específica com o vetor de “destino”, que também possui sequências específicas. O vetor AdRGD (gentilmente fornecido pelo Dr. Hiroyuki Mizuguchi, Osaka University, Japão) não contém os sítios de recombinação e, por este motivo, foi modificado com a introdução desses sítios.

Para a realização dessa modificação, primeiramente reestruturamos o vetor pShuttle 2 (Clontech) (Figura 9) retirando a sequência que codifica para o SV40 (sequência do *Simian virus* 40), a sequência poly A e um dos sítios de *Bgl* II, localizado na posição 1121.

Figura 9: Vetor pShuttle2 (Clontech).

Dessa forma obtivemos o vetor pShuttle_parte 1 (Figura 10A). Em seguida, outra modificação foi feita nesse novo vetor para extrairmos o promotor CMV e parte do *Multiple Cloning Site* (MCS), gerando o vetor o qual denominamos pShuttle_parte 2 (Figura 10B). Finalmente, inserimos nesse vetor a sequência Gateway, originando o vetor pShuttle-promoterless-DEST (Figura 10C).

(A)

(B)

(C)

Figura 10: (A) Vetor pShuttle_parte 1; (B) Vetor pShuttle_parte 2; (C) Vetor pShuttle-Promoterless-DEST.

A sequência Gateway foi extraída de um vetor já existente no nosso laboratório, o pAAV-dest (Figura 11). Ela é composta por duas sequências terminais *attR*, que necessárias para a recombinação sítio-específica com as sequências *attL* presentes no vetor adenoviral; pelo gene *ccdB*, o qual acarreta morte celular de certas linhagens de *E. coli* que não possuem resistência a ele e proporciona uma forma de controle negativo da recombinação; e pelo gene *Cm^R* que promove resistência ao cloranfenicol.

Figura 11: Vetor pAAV-dest.

A fim de confirmarmos a identidade dos vetores pShuttle_parte 1, pShuttle_parte 2 e pShuttle-Promoterless-DEST, um mapeamento com enzimas de restrição foi realizado, como pode ser observado na Figura 12. As enzimas utilizadas para digerir o vetor pShuttle_parte 1 foram *Bgl* II, *Hind* III e *Xho* I e esperávamos obter as bandas de 3,8 kb; 3;8 kb; e 2,4 + 1,4 kb respectivamente. Já para o vetor pShuttle_parte 2, utilizamos as enzimas *Xho* I, *Not* I, e *Not* I + *Hind* III esperando obter as bandas de 2,4 + 0,5 kb; 2,9 kb; e 1,9 + 1,0 kb respectivamente. E, por fim, para o vetor pShuttle-Promoterless-DEST, utilizamos as enzimas *Bam* HI, *Sma* I e *Not* I a fim de obtermos as bandas de 5,3 kb; 3,7 + 1,6 kb; e 2,9 + 2,4 kb respectivamente.

Figura 12: Foto de gel de agarose 1% mostrando o mapeamento dos vetores pShuttle_parte 1, pShuttle_parte 2 e pShuttle-Promoterless-DEST: Canaletas 1) Padrão de 1kb (Invitrogen); 2) Vetor pShuttle_parte 1 intacto; 3) Digestão do vetor pShuttle_parte 1 com *Bgl* II (NEB); 4) Digestão do vetor pShuttle_parte 1 com *Hind* III (Invitrogen); 5) Digestão do vetor pShuttle_parte 1 com *Xho* I (NEB); 6) Vetor pShuttle_parte 2 intacto; 7) Digestão do vetor pShuttle_parte 2 com *Xho* I; 8) Digestão do vetor pShuttle_parte 2 com *Not* I (NEB); 9) Digestão do vetor pShuttle_parte 2 com *Not* I e *Hind* III; 10) Vetor pShuttle-Promoterless-DEST intacto; 11) Digestão do vetor pShuttle-Promoterless-DEST com *Bam* HI (NEB); 12) Digestão com o vetor pShuttle-

Promoterless-DEST com *Sma* I (Invitrogen); 13) Digestão do vetor pShuttle-Promoterless-DEST com *Not* I.

Em seguida, a sequência contendo os sítios de recombinação foi isolada desse novo vetor e inserida no vetor AdRGD, de acordo com a lógica do protocolo do kit Adeno-X (Clontech). Um clone contendo a sequência de interesse foi isolado e denominado pAdRGD-Promoterless-DEST. Mapeamos o vetor AdRGD para sítios da enzima de restrição *Xho* I e *Pac* I e confirmamos que esses sítios estão na mesma posição que os sítios para essas mesmas enzimas no vetor pAdeno-X (Clontech), o qual não contém a modificação entre os resíduos 546 e 547 da proteína fibra do adenovírus com a inserção do tripeptídeo RGD. A digestão com *Xho* I no vetor AdRGD deveria, dessa forma, liberar as bandas de 14500, 8046, 5648, 2466, 1445 e 595 pb. Já a digestão com *Pac* I deveria liberar as bandas de 29727 e 2973 pb, o que é mostrado na Figura 13A. As Figuras 13B e 13C mostram o vetor pAdRGD-Promoterless-DEST que obtivemos. A digestão desse novo vetor com *Xho* I deveria liberar as bandas de 14500, 8046, 4796, 3367, 2466, 1445 e 595 pb.

Figura 13: (A) Foto de gel de agarose 1% mostrando o mapeamento do vetor pAdRGD: Canaletas 1) Padrão λ Hind III (NEB); 2) Digestão do vetor pAdRGD com a enzima Xho I (NEB); 3) Digestão do vetor pAdRGD com a enzima Pac I (NEB); (B) Vetor pAdRGD-Promoterless-DEST. (C) Foto de gel de agarose 1% mostrando o mapeamento do vetor pAdRGD-Promoterless-DEST. Canaletas 1) Padrão λ Hind III (NEB); 2) Padrão de 200pb (Invitrogen); 3) Vetor pAdRGD-Promoterless-DEST intacto; 4) Digestão do vetor pAdRGD-Promoterless-DEST com Hind III (Invitrogen); 5) Digestão do vetor pAdRGD-Promoterless-DEST com Xho I.

Em paralelo a essa construção, montamos também o vetor pShuttle-DEST (Figura 14A), inserindo a sequência Gateway no vetor pShuttle 2 sem modificações prévias. A Figura 14B mostra o mapeamento feito nesse vetor com as enzimas Not I, Bgl II, Sma I e Nco I, sendo que os fragmentos de DNA resultantes dessas digestões possuem os tamanhos 4,1 + 2,4 kb; 3,7 + 2,8 kb; 4,0 + 2,5 kb; e 4,8 + 1,7 kb respectivamente.

(A)

(B)

Figura 14: (A) Vetor pShuttle-DEST. (B) Foto de gel de agarose 1% mostrando o mapeamento do vetor pShuttle-DEST: Canaletas 1) Padrão λ Hind III (NEB); 2) Vetor pShuttle-DEST intacto; 3) Digestão do vetor pShuttle-DEST com *Not* I (NEB); 4) Digestão do vetor pShuttle-DEST com *Bgl* II (NEB); 5) Digestão do vetor pShuttle-DEST com *Sma* I (Invitrogen); 6) Digestão do vetor pShuttle-DEST com *Nco* I (Invitrogen).

Com a construção deste vetor, fomos capazes de montar o vetor pAdRGD-CMV-DEST (Figura 15), transpondo a sequência contendo os sítios de recombinação, bem como o promotor CMV e a região poly A do vetor pShuttle-DEST para o vetor AdRGD.

Figura 17: Vetor pAdRGD-PGeGFP

Figura 18: Vetor pAdRGD-PG-p19^{Arf}.

Figura 19: Vektor pAdRGD-PG-INF β .

Figura 20: Vektor pAdRGD-PG-INF β ^{IRES}p19^{Arf}.

Figura 21: Vetor pAdRGD-PG-luc.

Figura 22: Vetor pAdRGD-CMV-luc.

Todos os vetores foram digeridos com enzimas de restrição para confirmarmos sua identidade. Dessa forma, o vetor pAdRGD-PGeGFP, sendo digerido com a enzima *Xho* I, deveria liberar bandas dos tamanhos de 14500 + 8046 + 3367 + 2570 + 2466 + 2124 + 1445 + 595 pb e sendo digerido com *Pac* I deveria liberar as bandas de 32140 + 2973 pb (Figura 23).

Figura 23: Foto de gel de agarose 1% mostrando o mapeamento do vetor pAdRGD-PGeGFP: Canaletas 1) Padrão de 1kb (Invitrogen); 2) Vetor pAdRGD-PGeGFP intacto; 3) Digestão do vetor pAdRGD-PGeGFP com *Xho* I (NEB); 4) Digestão do vetor pAdRGD-PGeGFP com *Pac* I (NEB).

O mapeamento dos vetores pAdRGD-PG-p19^{Arf}, pAdRGD-PG-INF β e pAdRGD-PG-INF β ^{IRES}p19^{Arf} pode ser observado na Figura 24. Para o vetor pAdRGD-PG-p19^{Arf}, a digestão com a enzima *Xho* I liberou as bandas de 14500 + 8046 + 3367 + 2570 + 2466 + 1824 + 1445 + 595 pb e, sendo digerido com *Pac* I, liberou as bandas de 31840 + 2973 pb. Já o vetor pAdRGD-PG-INF β , a digestão com *Xho* I liberou as bandas de 14500 + 8046 + 3367 + 2570 + 2466 + 2124 + 1445 + 595 pb e a digestão com *Pac* I, as bandas de 32140 + 2973 pb. Por fim, para o vetor pAdRGD-PG-INF β ^{IRES}p19^{Arf}, a digestão com a enzima *Xho* I liberou as bandas de 14500 + 8046 + 5794 + 3367 + 2466 + 1445 + 595 pb e a digestão com *Pac* I, as bandas de 33240 + 2973 pb.

Figura 24: Foto de gel de agarose 1% mostrando o mapeamento dos vetores pAdRGD-PG-p19^{Arf}, pAdRGD-PG-INF β e pAdRGD-PG-INF β ^{IRES}p19^{Arf}: Canaletas 1) Padrão de 1kb (Invitrogen); 2) Vetor pAdRGD-PG-p19^{Arf} intacto; 3) Digestão do vetor pAdRGD-PG-p19^{Arf} com *Xho* I (NEB); 4) Digestão do vetor pAdRGD-PG-p19^{Arf} com *Pac* I (NEB); 5) Vetor pAdRGD-PG-INF β intacto; 6) Digestão do vetor pAdRGD-PG-INF β com *Xho* I; 7) Digestão do vetor pAdRGD-PG-INF β com *Pac* I; 8) Vetor pAdRGD-PG-INF β ^{IRES}p19^{Arf} intacto; 9) Digestão do vetor pAdRGD-PG-INF β ^{IRES}p19^{Arf} com *Xho* I; 10) Digestão do vetor pAdRGD-PG-INF β ^{IRES}p19^{Arf} com *Pac* I.

O mapeamento dos vetores pAdRGD-PG-luc e pAdRGD-CMV-luc foi realizado por digestão com a enzima *Xho* I. Com o primeiro vetor foi possível ver a liberação das bandas 14500 + 8046 + 4590 + 3367 + 2466 + 1445 + 1320 + 595 pb e com o segundo vetor verificamos as bandas 14500 + 8046 + 4495 + 4240 + 2466 + 1445 + 595 pb (Figura 25).

Figura 25: Foto de gel de agarose 1% mostrando o mapeamento dos vetores pAdRGD-PG-luc e pAdRGD-CMV-luc: Canaletas 1) Padrão de 1kb (NEB); 2) e 3) Vetor pAdRGD-PG-luc digerido com *Xho* I (NEB); 4) e 5) Vetor pAdRGD-CMV-luc digerido com *Xho* I.

4.4 Caracterização funcional dos adenovírus em cultura de células

4.4.1 Citometria de fluxo para detecção da expressão de eGFP

Com a detecção de eGFP sendo expresso pelas células transduzidas com o adenovírus AdRGD-PG-eGFP, pudemos observar que a inserção do tripeptídeo RGD no capsídeo adenoviral tornou o vírus capaz de infectar eficientemente tanto células B16mCAR (que possuem o receptor mCAR na superfície facilitando a internalização do adenovírus), quanto as células B16 que não possuem tal modificação (Figura 26). Para esse experimento, transduzimos as células com um MOI de 25 do vírus AdRGD-PG-eGFP e suplementamos o meio de cultura com 100 ng/mL de doxorrubicina 24 horas após a transdução, um quimioterápico que induz dano ao DNA e, dessa forma, estimula a proteína p53, estimulando por consequência, o promotor PG.

Figura 26: Gráficos mostrando a porcentagem de células B16 e B16mCAR transduzidas com MOI de 25 do vírus AdRGD-PG-eGFP. Os dados foram inferidos através da porcentagem de células cuja expressão de eGFP pode ser detectada em 3 experimentos independentes.

A partir desses resultados experimento pudemos observar também que a expressão do transgene direcionada pelo promotor PG se deu de forma eficiente, tanto nas células B16 como nas células B16mCAR e que a expressão de eGFP também é aumentada quando suplementamos o meio de cultura com doxorrubicina (Figura 27).

Figura 27: Gráficos mostrando a expressão relativa de eGFP detectado nas células B16 e B16mCAR transduzidas com quantidades iguais do vírus AdRGD-PG-eGFP. Os dados foram inferidos através da detecção da expressão média de eGFP pelas células em 3 experimentos independentes.

Com isso, podemos afirmar que ocorre uma transdução eficiente do vírus modificado até mesmo em células que não possuem o receptor CAR. No caso de as células possuírem tal receptor, a transdução não é prejudicada, mas aparentemente elevada.

4.4.2 IMF para a detecção da expressão de $p19^{Arf}$

Células B16 foram submetidas ao ensaio de IMF para detecção de $p19^{Arf}$. Essas células foram transduzidas com um MOI de 25 dos vírus AdRGD-PG- $p19^{Arf}$, AdRGD-PG- $IFN\beta^{IRES}p19^{Arf}$, a combinação AdRGD-PG- $p19^{Arf}$ + AdRGD-PG-IFNB e dos vírus AdRGD-PG-eGFP e AdRGD-PG-IFNB, utilizados como controles negativos. Como visto na Figura 28, a presença de $p19^{Arf}$ foi detectada no nucléolo das células, o que indica que está havendo uma expressão adequada do transgene de interesse.

Figura 28: As células B16 foram transduzidas com um MOI de 25 de cada vírus e submetidas ao ensaio de IMF após 48 horas. Como esperado, as células transduzidas com AdRGD-PG- $p19^{Arf}$, com AdRGD-PG- $IFN\beta^{IRES}p19^{Arf}$ e com a combinação AdRGD-PG- $p19^{Arf}$ + AdRGD-PG-IFNB apresentaram marcação nucleolar.

4.4.3 ELISA para a detecção da expressão de IFN β

Com o ensaio de ELISA fomos capazes de detectar a presença de IFN β no meio de cultura coletado após o cultivo das células B16 transduzidas com um MOI de 25 dos vírus produzidos. Dessa forma, podemos inferir que o IFN β presente no meio foi produzido pelos vetores AdRGD-PG-IFN β e AdRGD-PG-IFN β^{IRES} p19^{Arf}. Nesse ensaio (Figura 29), observamos uma baixa expressão de IFN β quando as células não são transduzidas ou quando são transduzidas com o vírus AdRGD-PG-eGFP ou AdRGD-PG-p19^{Arf}. No entanto, a expressão de IFN β é muito alta quando as células são transduzidas com os vírus AdRGD-PG-IFN β , AdRGD-PG-IFN β^{IRES} p19^{Arf} ou com a combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β . Esse resultado, portanto, evidencia que existe uma expressão adequada de IFN β dos vetores AdRGD-PG-IFN β e AdRGD-PG-IFN β^{IRES} p19^{Arf} construídos.

Figura 29: As células B16 foram transduzidas com os vírus AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , AdRGD-PG-IFN β^{IRES} p19^{Arf} e com a combinação AdRGD-PG-p19^{Arf} + AdRGD-PG-IFN β e o sobrenadante dessas foi coletado após 48 horas para o ensaio de ELISA.

4.4.4 Ensaio de ciclo celular

Com esse ensaio, células B16 foram analisadas para averiguarmos seu perfil do ciclo celular, após 24, 36, 48 e 60 horas da transdução com os vetores construídos. Podemos notar, na Figura 30, que a porcentagem de células morrendo pela ação dos vetores aumenta gradativamente com o tempo. Além disso, essa porcentagem é maior quando as células são

tratadas com o vetor bicistrônico ou com a combinação dos vetores monocistrônicos, em comparação com o tratamento utilizando os vetores AdRGD-PG-p19^{Arf} e AdRGD-PG-IFN β isolados.

Usando estes vetores, confirmamos a expressão dos transgenes e também temos observado que o tratamento de células B16 resulta em morte celular maciça especialmente quando a combinação de p19^{Arf} e IFN β é aplicada, mas não com a transdução de um só destes fatores. Além disso, observamos que apesar de a combinação dos transgenes ocasionar aumento da morte celular, até mesmo a aplicação de cada transgene isolado nas células B16 acarreta uma parada na fase G1 do ciclo celular.

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 30: Avaliação de alteração no ciclo celular induzida pelo tratamento com os vetores adenovirais. Células B16 foram transduzidas com um MOI de 50, incubadas durante 24 horas (A), 36 horas (B), 48 horas (C) e 60 horas (D), fixadas e coradas com iodeto de propídeo antes da sua análise por citometria de fluxo. Os gráficos representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

Os vetores adenovirais contendo o tripeptídeo RGD na proteína fibra e portando os transgenes de interesse constituem novas ferramentas que possibilitam a transferência de p19^{Arf} e IFN β em um maior espectro de células alvo. Nos ensaios descritos até o momento, observamos que essa modificação permitiu a eficiente transdução do vetor independentemente do receptor CAR nas células de melanoma, B16. Isso já indica o potencial que esse vetor adenoviral possui. No entanto, ainda é necessária a execução de ensaios adicionais para averiguar a capacidade de transdução do vetor em outras linhagens celulares, que expressam ou não, o receptor CAR na sua superfície. Esse desafio é bastante interessante para o grupo, já que trabalhamos com outras linhagens, como LLC1, 4T1, etc. Além disso, esperamos que essa nova capacidade de transdução possa, futuramente, trazer um benefício para seu uso na clínica, ainda que não é possível ter certeza de como será a atuação efetiva do vetor, uma vez aplicado no contexto da terapia gênica.

A modificação da fibra do vetor adenoviral, com a inserção do tripeptídeo RGD, nos obrigou a alterar a forma de purificação dos vetores, que usualmente utiliza um gradiente de cloreto de cério para tal. Em nossas observações, notamos que quando os vetores modificados são aplicados no gradiente de cloreto de cério e ultracentrifugados, não é possível a formação de uma banda viral nesse gradiente, impossibilitando a retirada dos adenovírus do gradiente e, de fato, isso não foi constatado apenas por nosso grupo. (Peng et al., 2006) encontraram dificuldades com a purificação de vetores adenovirais contendo RGD na fibra quando o gradiente utilizado é o de cloreto de cério, pois o vetor modificado tende a agregar, especialmente na segunda rodada de ultracentrifugação, formando flocos sem que haja a formação da banda adenoviral (Peng et al., 2006). A razão da formação do agregado viral quando vetores adenovirais modificados com a inserção de RGD na fibra são aplicados em gradiente de cloreto de cério ainda é desconhecida, mas possivelmente ocorre devido a alterações na interação entre os vetores ou entre vetores e proteínas celulares (Peng et al., 2006). Em nosso caso, observamos realmente a formação de flocos esbranquiçados na parte superior do tubo após a ultracentrifugação desse, o que corresponderia à interação e agregação dos vetores. No entanto, essa formação ocorreu já na primeira etapa de ultracentrifugação, impedindo que coletássemos os vetores e partíssemos para a segunda etapa. Para contornar esse problema, (Peng et al., 2006) utilizaram um gradiente formado de iodixanol, já que esse agente é eficiente em isolar células (Patel et al., 1993; Ruedl et al., 1996), organelas (Graham et al., 1994; Smart et al., 1995), macromoléculas (Basi e Rebois, 1997; Graham et al., 1996) e

vírus (Zolotukhin et al., 1999). Utilizando a ultracentrifugação em densidade descontínua de iodixanol, seguida por cromatografia de exclusão por tamanho, os autores isolaram e purificaram com sucesso tanto vetores com e sem a inserção de RGD na fibra, que apresentaram um grau de pureza e infectividade comparáveis aos vetores purificados com o gradiente de cloreto de cério (Peng et al., 2006). A partir desses resultados, nós também fomos capazes de proceder com o novo método de purificação e obter vetores adenovirais purificados para a utilização em ensaios na cultura de célula, como descrito anteriormente. Além disso, o iodixanol tem sido usado com segurança na clínica para diagnóstico intravascular por imagem de doenças do coração, cérebro, rim, vasos sanguíneos e outros órgãos (Fountaine et al., 1996; Spencer e Goa, 1996), tendo mostrado nenhuma citotoxicidade ou efeitos colaterais contra qualquer molécula biológica testada até o momento em sua presença (Ford et al., 1994).

O locus *INK4A-ARF* (*CDKN2A*) no cromossomo 9p21, frequentemente deletado no melanoma, está fortemente implicado na supressão dessa doença (Chin et al., 2006). A deleção no locus *CDKN2A* é atualmente o segundo evento mais frequente no câncer, somando 40% dos casos (Haber, 1997), estando atrás apenas de alterações em TP53 (Ha et al., 2007). *INK4A-ARF* codifica dois supressores tumorais distintos, inicialmente transcritos por promotores separados e lidos em duas janelas de leitura diferentes: p16^{INK4A} e p14^{ARF} (p19^{Arf} em camundongos). *INK4A* regula positivamente o supressor de tumor pRB, através da inibição de CDK4 e, numerosos estudos têm documentado inativação de *INK4A* em melanomas humanos, frequentemente com falta de *ARF* (Chin et al., 2006). Porém, a relevância da perda da função de *ARF* como um evento distinto em melanoma tem sido demonstrada por relatos de mutações específicas de *ARF*, independentes de *INK4A* e metilação do promotor específico de *ARF* (Chin et al., 2006). Em contraste, mutações de TP53 não são frequentes em melanomas humanos primários (Hussein et al., 2003) e, quando mutações em TP53 ocorrem, essa proteína tende a reter sua função transativadora (Soussi et al., 2005). No nosso trabalho, observamos que a utilização do transgene p19^{Arf} como forma de intervir no ciclo das células B16 se mostrou, como havíamos previsto, benéfica no combate de células B16, sendo capaz de causar um aumento da porcentagem de células em morte e ocasionar uma parada do ciclo celular, possivelmente devido à atuação de *Arf* na via de p53. Existem muitos relatos sobre a atuação predominante de *ARF* como um regulador positivo do supressor tumoral p53, através de inibição de MDM2 (Sherr, 2006). (Saadatmandi et al., 2002) utilizaram um vetor adenoviral com expressão do éxon 1β de *ARF*, o qual é suficiente para inibir a atividade de MDM2, estabilizar p53 e induzir parada do ciclo celular (Rizos et

al., 2000) e observaram que sua transdução em células MCF7 (que não possuem ARF endógeno e expressam p53 endógeno selvagem) causa um efeito anti-tumoral, uma vez que o p53 endógeno selvagem contribui para a supressão do crescimento e viabilidade tumoral mediada por Ad1 β , mas não é estritamente requerido.

Entretanto, evidências experimentais têm recentemente demonstrado papéis de ARF distintos da sua habilidade em regular a estabilização de p53. Nos fibroblastos, a inativação de p53 é suficiente para prevenir sua senescência e a expressão de ARF pode levar à parada do crescimento dessas células e à senescência na presença de p53 funcional. Já nos melanócitos, Arf pode regular a senescência de uma maneira independente de p53 e distinta de Ink4a. A perda de Arf em melanócitos resulta em uma forte vantagem proliferativa em relação à perda de p53 ou Ink4a, sendo que, nas últimas, restaurar Arf induz parada do crescimento celular e alterações morfológicas relacionadas à senescência, independente do status de p53 (Ha et al., 2007). Nesse trabalho, os autores mostram também que melanócitos deficientes para Arf se proliferam em taxas maiores em relação aos que mantêm Arf selvagem, sendo que essa diferença fenotípica aparentemente não é afetada pelo status funcional de p53 e que a perda de p53 é insuficiente para permitir que melanócitos possam escapar da senescência. (Ha et al., 2007). Além disso, (Saadatmandi et al., 2002) observaram que Ad1 β causou um efeito supressor de tumor, manifestado através da indução da parada do ciclo celular e/ou morte celular, em duas linhagens tumorais que expressam p53 endógeno mutante (T98G e DU145), evidenciando a atividade de ARF independente de p53. Além disso, uma vez que essas células não possuem uma via de Rb funcional, os resultados apontam para a atividade de ARF que é independente, também, de Rb. No entanto, evidências de que a morte dessas células é causada por apoptose só foram observadas nas linhagens que expressam p53 endógeno selvagem, como LnCAP e U87.

Camundongos deficientes para ARF e p53 não exibem fenótipos tumorais idênticos, e ARF interage com uma variedade de outras proteínas, incluindo E2F-1, Myc, NF κ B e CtBP, e pode atuar independentemente de p53 na biosíntese ribossômica, resposta ao dano no DNA, apoptose e autofagia (Sherr, 2006). No estudo feito por (Ha et al., 2007), foi verificado que a atividade de E2F1 foi aumentada em melanócitos desprovidos de Arf e que, uma vez que Arf regula negativamente os níveis de E2F1 nos melanócitos através de um mecanismo de degradação via proteassomo, essa regulação poderia estar relacionada, em parte, com a parada do ciclo celular de melanócitos. Uma vez que ARF interage com várias proteínas além de MDM2, tais como E2F-1 (Eymin et al., 2001), topoisomerase (Karayan et al., 2001), MDMX (Jackson et al., 2001) e CARF (Hasan et al., 2002) as quais podem interferir na atividade de

ARF em certas linhagens tumorais humanas, esse mecanismo pode ser responsável pela supressão tumoral de ARF independente de p53. Além disso, a interação de ARF com a maquinaria de replicação do DNA poderia interromper a mitose e levar a célula à morte, através de uma via não-apoptótica independente de p53. Dessa forma, acreditamos que as aplicações terapêuticas de ARF podem se estender tanto a tumores que apresentam expressão de p53 selvagem, como é o caso do melanoma, quanto a tumores que não possuem p53 selvagem ou, então, que não possuem ambos p53 e Rb selvagens.

Apesar de Arf demonstrar um efeito anti-tumoral quando aplicado sozinho à células B16, observamos que a aplicação desse transgene em conjunto com o IFN β gerou um efeito intensificado no ciclo dessas células. Isso é possível, já que a proteína IFN β possui, dentre as suas várias funções imunomoduladoras, a de atuar no ciclo celular e interagir com p53. Além disso, essa proteína traz o benefício de ser secretada e poder atingir e atuar nas células vizinhas, mesmo que essas não tenham sido transduzidas com o vetor e, talvez, estimular o sistema imunológico do paciente se aplicada na clínica. Dessa forma, esperamos que a ação anti-tumoral e anti-angiogênica do IFN β se some à ativação do sistema imunológico no combate ao tumor primário e metastático.

Os genes de expressão do IFN α e IFN β se localizam no cromossomo 9p22, um locus que também é comumente perdido no melanoma (Pfeffer et al., 1998; Legha et al., 1998; Cowan et al., 1988). Atuando em relação à perda de proteínas reguladoras do ciclo celular do cromossomo 9p21, INK4a e ARF, o sistema de IFN pode ser um elemento crítico no controle da progressão de células de melanoma transformadas para massas tumorais malignas (Borden et al., 2000). Interferons do tipo I se ligam ao mesmo receptor, o qual leva à ativação da via de sinalização de *Janus-activated kinase/STAT* e mudanças na expressão gênica (Stark et al., 1998). IFN por si só apresentam efeitos citotóxicos em células tumorais, incluindo melanoma. O efeito antitumoral nas células de melanoma tem sido atribuído à inibição do crescimento celular (Qin et al., 1997) e indução de apoptose (Chawla-Sarkar et al., 2002).

IFN regulam transcricionalmente mais de 100 genes (Stark et al., 1998). Alguns desses genes estimulados por IFN estão associados com a indução de apoptose (de Veer et al., 2001). IFN β apresentam um efeito antiproliferativo (Borden et al., 1982) e um efeito apoptótico maiores em células de melanoma *in vitro*, quando comparados com IFN α 2 (Chawla-Sarkar et al., 2001). IFN tipo I administrados de forma exógena são utilizados na clínica para tratar uma variedade de malignidades, incluindo a tricoleucemia, melanoma, carcinoma de células renais e sarcoma de Kaposi (Belardelli et al., 2002). IFN para o melanoma metastático, quando administrado sistemicamente, resulta na regressão da doença entre 15 a 20 % dos pacientes

(Creagan et al., 1986). No entanto, o uso do IFN através da forma como proteína recombinante, pode gerar toxicidade relacionada a altas doses nos pacientes, o que indica a vantagem do uso de um vetor para a transferência desse gene.

Estudos pré-clínicos em camundongos imunodeficientes tratados com o vetor AdhIFN β (vetor adenoviral carregando o gene de IFN β humano) resultou na expressão intra-tumoral do transgene e regressão de uma variedade de tumores xenográficos (Qin et al., 2001). Em camundongos imunocompetentes, o tratamento com AdmIFN β (vetor adenoviral carregando o gene de IFN β murino) de tumores intraperitoniais ativou células T CD8⁺, as quais levaram à erradicação tanto do tumor intraperitoneal tratado, quanto tumores subcutâneos distantes não tratados, resultando em uma resistência a longo prazo a um novo desafio tumoral (Chiocca et al., 2008). Para pacientes com melanoma metastático, IFN são mais efetivos contra massas tumorais pequenas do que contra massas maiores. Em estudos pré-clínicos, IFN mostram atividade imunomodulatória aumentando as funções de células T, células NK, macrófagos e células dendríticas. Em adição, IFN inibem a proliferação de células de melanoma e modulam a expressão de um número de genes críticos que influenciam o efeito imunológico de reconhecimento celular e genes que influenciam o ciclo celular (Pfeffer et al., 1998). Por isso, IFN permanecem como a terapia adjuvante mais ativa contra o melanoma para pacientes em estágio de alto risco de recorrência da doença.

IFN β induz apoptose através da ativação da cascata de caspases, liberando citocromo *c* mitocondrial e promovendo fragmentação do DNA. Entretanto, essa ativação é tardia (após 72 horas), implicando efetores celulares intermediários (Chawla-Sarkar et al., 2002). Como já mencionado, (Takaoka et al., 2003) observaram que células tratadas com proteína recombinante IFN α ou IFN β respondem com um aumento do nível de proteína p53 e que foi identificado um elemento ISRE, responsivo a ISGF3, no promotor do gene de p53, mostrando que a indução de p53 por IFN β é causada por ativação transcricional. Dessa forma, a combinação dos transgenes traz mais uma vantagem, além das anteriores descritas. Ambos os transgenes atuam na via de p53, o que pode representar um auxílio na ativação do promotor do vetor adenoviral. Quando a aplicação dos transgenes ocorre através da utilização de um vetor bicistrônico, há a transferência simultânea de ambos os transgenes à célula alvo e, com isso, pode-se ter uma maior eficiência da terapia gênica, além de evitar uma possível interferência entre as atividades de dois promotores fortes quando a aplicação dos transgenes ocorre em vetores monocistrônicos. Apesar de os resultados obtidos aqui com a combinação dos vetores monocistrônicos ou com o vetor bicistrônico serem equiparáveis, a utilização de um vetor bicistrônico pode ser, portanto, mais eficaz.

6 CONCLUSÕES

Com esse projeto, fomos capazes de modificar o sistema AdRGD para ser compatível com o sistema Gateway e, com isso, construir vetores que apresentam capacidade de transdução aprimorada e um conjunto de transgenes que estimulam a morte de células B16, bem como uma parada do seu ciclo celular, sob o controle de expressão do promotor PG. Os vetores adenovirais AdRGD-PG-eGFP, AdRGD-PG-p19^{Arf}, AdRGD-PG-IFN β , e AdRGD-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf} tiveram a expressão de seus transgenes explorada em cultura de células eficientemente. Realizamos ensaios como Elisa e imunofluorescência para explorar, respectivamente, a transferência gênica de IFN β e p19^{Arf}, ou sua combinação, em células B16, além de ensaios para detectar a expressão de eGFP por citometria de fluxo. Todos os ensaios foram satisfatórios. Por fim, observamos, por coloração com iodeto de propídeo, o ciclo das células B16 transduzidas com os vetores e verificamos que eles acarretam morte das células e parada do ciclo celular. Além disso, nossos ensaios indicam com segurança que a combinação dos vírus AdRGD-PG-p19^{Arf} e AdRGD-PG-IFN β , ou então o vírus bicistrônico AdRGD-PG-IFN β ^{IRES}p19^{Arf} acarretam um nível de morte celular maior que os vetores monocistrônicos isolados. Por isso, pretendemos continuar nossos estudos a fim de verificar os genes ou as vias gênicas envolvidos com a morte celular e estimulados pelos transgenes, quando utilizados de forma isolada ou em conjunto e, talvez, descobrir novas ferramentas possíveis de serem exploradas no contexto da terapia gênica.

REFERÊNCIAS³

- Alizadeh H, Howard K, Mellon J, Mayhew E, Rusciano D, Niederkorn JY. Reduction of liver metastasis of intraocular melanoma by interferon-beta gene transfer. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44:3042-51.
- Argentini M, Barboule N, Wasylyk B. The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability. *Oncogene*. 2001;20:1267-75.
- Bajgelman MC, Strauss BE. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. *Virology*. 2008;371:8-13.
- Basi NS, Rebois, RV. Rate zonal sedimentation of proteins in one hour or less. *Anal Biochem*. 1997;251:103-9.
- Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13:119-34.
- Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;224:241-8.
- Blattner C, Hay T, Meek DW, Lane DP. Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol Cell Biol*. 2002;22:6170-82.
- Borden EC, Hogan TF, Voelkel JG. Comparative antiproliferative activity in vitro of natural interferons alpha and beta for diploid and transformed human cells. *Cancer Res*. 1982;42:4948-53.
- Borden EC, Lindner D, Dreicer R, Hussein M, Peereboom D. Second-generation interferons for cancer: clinical targets. *Semin Cancer Biol*. 2000;10:125-44.
- Bothner B, Lewis WS, DiGiammarino EL, Weber JD, Bothner SJ, Kriwacki RW. Defining the molecular basis of Arf and Hdm2 interactions. *J Mol Biol*. 2001;314:263-77.
- Brem H, Gresser I, Grosfeld J, Folkman J. The combination of antiangiogenic agents to inhibit primary tumor growth and metastasis. *J Pediatr Surg*. 1993;28:1253-7.
- Cao G, Su J, Lu W, Zhang F, Zhao G, Marteralli D, et al. Adenovirus-mediated interferon-beta gene therapy suppresses growth and metastasis of human prostate cancer in nude mice. *Cancer Gene Ther*. 2001;8:497-505.
- Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Borden EC. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2001;7:1821-31.

³ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Jacobs BS, Borden EC. IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis. *J Immunol.* 2002;169:847-55.
- Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* 2006;20:2149-82.
- Chiocca EA, Smith KM, McKinney B, Palmer CA, Rosenfeld S, Lillehei K, Hamilton A, DeMasters BK, Judy K, Kirn D. A phase I trial of Ad.hIFN-beta gene therapy for glioma. *Mol Ther.* 2008;16:618-26.
- Chipuk JE, Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006;13:994-1002.
- Cowan JM, Halaban R, Francke U. Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas. *J Natl Cancer Inst.* 1988;80:1159-64.
- Creagan ET, Ahmann DL, Frytak S, Long HJ, Chang MN, Itri LM. Phase II trials of recombinant leukocyte A interferon in disseminated malignant melanoma: results in 96 patients. *Cancer Treat Rep.* 1986;70:619-24.
- de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol.* 2001;69:912-20.
- Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem.* 1994;269:7059-61.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet.* 1993;4:42-6.
- el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol.* 1998;8:345-57.
- el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet.* 1992;1:45-9.
- Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* 2000;60:129-33.
- Eymin B, Karayan L, Séité P, Brambilla C, Brambilla E, Larsen CJ, et al. Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene.* 2001;20:1033-41.
- Ford T, Graham J, Rickwood D. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem.* 1994;220:360-6.
- Förster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H, Hill CP. The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell.* 2005;18:589-99.

Fountaine H, Harnish P, Andrew E, Grynne B. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of iodixanol injection, a nonionic, isosmolar, hexa-iodinated contrast agent. *Acad Radiol.* 1996;3 (Suppl 3):S475-84.

Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol.* 1992;12:2866-71.

Gene therapy clinical trials worldwide. [homepage on the Internet]. EUA: Journal of gene medicine; 2011. Disponível em: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/> [2011 jul 25].

Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat.* 2003;21:217-28.

Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer.* 2007;109:455-64.

Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003;426:895-9.

Graham J, Ford T, Rickwood D. The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. *Anal Biochem.* 1994;220:367-73.

Graham JM, Higgins JA, Gillott T, Taylor T, Wilkinson J, Ford T, Billington D. A novel method for the rapid separation of plasma lipoproteins using self-generating gradients of iodixanol. *Atherosclerosis.* 1996;124:125-35.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994;54:4855-78.

Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:606-16.

Grossman SR, Perez M, Kung AL, Joseph M, Mansur C, Xiao ZX, et al. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell.* 1998;2:405-15.

Ha L, Ichikawa T, Anver M, Dickins R, Lowe S, Sharpless NE, Krimpenfort P, Depinho RA, Bennett DC., Sviderskaya EV, Merlino G. ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:10968-73.

Haber DA. Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19ARF. *Cell.* 1997;91:555-8.

Hasan MK, Yaguchi T, Sugihara T, Kumar PK, Taira K, Reddel RR, et al. CARF is a novel protein that cooperates with mouse p19ARF (human p14ARF) in activating p53. *J Biol Chem.* 2002;277:37765-70.

Haupt Y, Barak Y, Oren M. Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *Embo J.* 1996;15:1596-606.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387:296-99.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:3551-5.

Horwood NJ, Smith C, Andreakos E, Quattrocchi E, Brennan FM, Feldmann M, et al. High-efficiency gene transfer into nontransformed cells: utility for studying gene regulation and analysis of potential therapeutic targets. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S215-25.

Hsiao M, Low J, Dorn E, Ku D, Pattengale P, Yeargin J, Haas M. Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *American Journal of Pathology*. 1994;145:702-14.

Hu G, Mancl ME, Barnes BJ. Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death. *Cancer Res*. 2005;65:7403-12.

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. *Eur J Cancer Prev*. 2003;12:93-100.

Instituto Nacional de Câncer. [página na Internet]. São Paulo: INCA; 1996. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/> [2011 jul 25].

Jackson MW, Lindstrom MS, Berberich SJ. MdmX binding to ARF affects Mdm2 protein stability and p53 transactivation. *J Biol Chem*. 2001;276:25336-41.

James CD, He J, Carlbom E, Nordenskjold M, Cavenee WK, Collins VP. Chromosome 9 deletion mapping reveals interferon alpha and interferon beta-1 gene deletions in human glial tumors. *Cancer Research*. 1991;51:1684-8.

Joseph TW, Moll UM. Analysis of nuclear and cytoplasmic degradation of p53 in cells after stress. *Methods Mol Biol*. 2003;234:211-7.

Joseph TW, Zaika A, Moll UM. Nuclear and cytoplasmic degradation of endogenous p53 and HDM2 occurs during down-regulation of the p53 response after multiple types of DNA damage. *FASEB J*. 2003;17:1622-30.

Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8292-7.

Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Jones D, Giles F, Garcia-Manero G, et al. Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon-alpha-based regimens in newly diagnosed chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2006;108:1835-40.

Karayan L, Riou JF, Séité P, Migeon J, Cantereau A, Larsen CJ. Human ARF protein interacts with topoisomerase I and stimulates its activity. *Oncogene*. 2001;20:836-48.

Kastan MB. Wild-type p53: tumors can't stand it. *Cell*. 2007;128:837-40.

Kavanagh D, Hill AD, Dijkstra B, Kennelly R, McDermott EM, O'Higgins NJ. Adjuvant therapies in the treatment of stage II and III malignant melanoma. *Surgeon Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh & Ireland*. 2005;3:245-56.

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. 1991;252:1708-11.

Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science*. 1992;256:827-30.

Kubo N, Okoshi R, Nakashima K, Shimozato O, Nakagawara A, Ozaki T. MDM2 promotes the proteasomal degradation of p73 through the interaction with Itch in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;403:405-11.

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, et al. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 1996;274:948-53.

Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*. 1999;18:7644-55.

Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*. 2002;416:763-7.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-6.

Lane DP, Cheok CF, Lain S. p53-based Cancer Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:a001222

Legha SS, Ring S, Eton O, Bedikian A, Buzaid AC, Plager C, Papadopoulos N. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1998;16:1752-9.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88:323-31.

Li L, Deng XW. The COP9 signalosome: an alternative lid for the 26S proteasome? *Trends Cell Biol*. 2003;13:507-9.

Lowe SW, Ruley HE. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev*. 1993;7:535-45.

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*. 1993a;74:957-67.

Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*. 1993b;362:847-9.

Lu W, Fidler IJ, Dong Z. Eradication of primary murine fibrosarcomas and induction of systemic immunity by adenovirus-mediated interferon beta gene therapy. *Cancer Research*. 1999;59:5202-8.

Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell*. 2006;127:1323-34.

Merkel CA, da Silva Soares RB, de Carvalho AC, Zanatta DB, Bajgelman MC, Fratini P, Costanzi-Strauss E, Strauss BE. Activation of endogenous p53 by combined p19Arf gene transfer and nutlin-3 drug treatment modalities in the murine cell lines B16 and C6. *BMC Cancer*. 2010;10:316.

Midgley CA, Desterro JM, Saville MK, Howard S, Sparks A, Hay RT, et al. An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene*. 2000;19:2312-23.

Miyakoshi J, Dobler KD, Allalunis-Turner J, McKean JD, Petruk K, Allen PB, Aronyk KN, Weir B, Huyser-Wierenga D, Fulton D. Absence of IFNA and IFNB genes from human malignant glioma cell lines and lack of correlation with cellular sensitivity to interferons. *Cancer Research*. 1990;50:278-83.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang H-G, Lii H-K, Hoffman B, Lieberman D, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994;9(6):1799-805.

Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Utoguchi N, Watanabe Y, Kay MA, Hayakawa T. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther*. 2001;8:730-5.

Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene*. 2002;21:2914-8.

Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992;158:97-129.

Natsume A, Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J. Antitumor effect and cellular immunity activation by murine interferon-beta gene transfer against intracerebral glioma in mouse. *Gene Ther*. 1999;6:1626-33.

Natsume A, Tsujimura K, Mizuno M, Takahashi T, Yoshida J. IFN-beta gene therapy induces systemic antitumor immunity against malignant glioma. *J Neurooncol*. 2000;47:117-24.

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. 1992;358:80-3.

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:a001008.

Olsson A, Manzl C, Strasser A, Villunger A. How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2007;14:1561-75.

Orlowski M, Wilk S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys.* 2003;415:1-5.

Patel D, Rubbi CP, Rickwood D. Use of density perturbation to isolate immunologically distinct populations of cells. *J Immunol Methods.* 1993;163:241-51.

Peng HH, Wu S, Davis JJ, Wang L, Roth JA, Marini FC, Fang B. A rapid and efficient method for purification of recombinant adenovirus with arginine-glycine-aspartic acid-modified fibers. *Anal Biochem.* 2006;354:140-7.

Perry ME. The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a000968.

Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res.* 1998;58:2489-99.

Pinyol M, Hernandez L, Martinez A, Cobo F, Hernandez S, Bea S, Lopez-Guillermo A, Nayach I, Palacin A, Nadal A, Fernández PL, Montserrat E, Cardesa A, Campo E. INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type p53 gene. *Am J Pathol.* 2000;156:1987-96.

Polsky D, Bastian BC, Hazan C, Melzer K, Pack J, Houghton A, Busam K, Cordon-Cardo C, Osman I. HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer Res.* 2001;61:7642-6.

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlov I, Lee HW, Cordon-Cardo C, de Pinho RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell.* 1998;92:713-23.

Porta C, Hadj-Slimane R, Nejmeddine M, Pampin M, Tovey MG, Espert L, Alvarez S, Chelbi-Alix MK. Interferons alpha and gamma induce p53-dependent and p53-independent apoptosis, respectively. *Oncogene.* 2005;24:605-15.

Qin XQ, Beckham C, Brown JL, Lukashev M, Barsoum J. Human and mouse IFN-beta gene therapy exhibits different anti-tumor mechanisms in mouse models. *Mol Ther.* 2001;4:356-64.

Qin XQ, Runkel L, Deck C, DeDios C, Barsoum J. Interferon-beta induces S phase accumulation selectively in human transformed cells. *J Interferon Cytokine Res.* 1997;17:355-67.

Ravandi F, Estrov Z, Kurzrock R, Breitmeyer JB, Maschek BJ, Talpaz M. A phase I study of recombinant interferon-beta in patients with advanced malignant disease. *Clin Cancer Res.* 1999;5:3990-8.

Rizos H, Darmanian AP, Mann GJ, Kefford RF. Two arginine rich domains in the p14ARF tumour suppressor mediate nucleolar localization. *Oncogene*. 2000;19:2978-85.

Robertson KD, Jones PA. The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol Cell Biol*. 1998;18:6457-73.

Roy-Chowdhury J, Horwitz MS. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. *Mol Ther*. 2002;5:340-4.

Ruedl C, Rieser C, Böck G, Wick G, Wolf H. Phenotypic and functional characterization of CD11c+ dendritic cell population in mouse Peyer's patches. *Eur J Immunol*. 1996;26:1801-6.

Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*. 2000;81:2573-604.

Saadatmandi N, Tyler T, Huang Y, Haghighi A, Frost G, Borgstrom P, Gjerset RA. Growth suppression by a p14(ARF) exon 1beta adenovirus in human tumor cell lines of varying p53 and Rb status. *Cancer Gene Ther*. 2002;9:830-9.

Sabel MS, Sondak VK. Pros and cons of adjuvant interferon in the treatment of melanoma.[see comment]. *Oncologist*. 2003;8:451-8.

Sakurai F, Terada T, Maruyama M, Watanabe Y, Yamashita F, Takakura Y, et al. Therapeutic effect of intravenous delivery of lipoplexes containing the interferon-beta gene and poly I: poly C in a murine lung metastasis model. *Cancer Gene Ther*. 2003;10:661-8.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sandoval R, Xue J, Pilkinton M, Salvi D, Kiyokawa H, Colamonici OR. Different requirements for the cytostatic and apoptotic effects of type I interferons. Induction of apoptosis requires ARF but not p53 in osteosarcoma cell lines. *J Biol Chem*. 2004;279:32275-80.

Sato M, Taniguchi T, Tanaka N. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors -- studies from gene knockout mice. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2001;12:133-42.

Sdek P, Ying H, Chang DL, Qiu W, Zheng H, Touitou R, et al. MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Mol Cell*. 2005;20:699-708.

Sharpless E, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene*. 2003;22:3092-8.

Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:663-73.

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. 1997;91:325-34.

- Shimizu H, Burch LR, Smith AJ, Dornan D, Wallace M, Ball KL, et al. The conformationally flexible S9-S10 linker region in the core domain of p53 contains a novel MDM2 binding site whose mutation increases ubiquitination of p53 in vivo. *J Biol Chem*. 2002;277:28446-58.
- Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10104-8.
- Soussi T, Kato S, Levy PP, Ishioka C. Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat*. 2005;25:6-17.
- Spencer CM, Goa K. Iodixanol. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and diagnostic use as an x-ray contrast medium. *Drugs*. 1996;52:899-927.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:227-64.
- Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:165-8.
- Strauss BE, Bajgelman MC, Costanzi-Strauss E. A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition. *Cancer Gene Ther*. 2005;12:935-46.
- Strauss BE, Costanzi-Strauss E. pCLPG: a p53-driven retroviral system. *Virology*. 2004;321:165-72.
- Strauss BE, Haas M. The region 3' to the major transcriptional start site of the MDR1 downstream promoter mediates activation by a subset of mutant P53 proteins. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1995;217:333-40.
- Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003;424:516-23.
- Toledo F, Wahl GM. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:1476-82.
- Tsuji K, Mizumoto K, Sudo H, Kouyama K, Ogata E, Matsuoka M. p53-independent apoptosis is induced by the p19ARF tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;295:621-9.
- Ulasov IV, Tyler MA, Han Y, Glasgow JN, Lesniak MS. Novel recombinant adenoviral vector that targets the interleukin-13 receptor alpha2 chain permits effective gene transfer to malignant glioma. *Hum Gene Ther*. 2007;18:118-29.
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*. 2007;445:661-5.
- Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:275-83.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:594-604.

Weber JD, Kuo ML, Bothner B, DiGiammarino EL, Kriwacki RW, Roussel MF, et al. Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol Cell Biol*. 2000;20:2517-28.

Xirodimas DP, Stephen CW, Lane DP. Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. *Exp Cell Res*. 2001;270:66-77.

Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007;445:656-60.

Yamashita M, Ino A, Kawabata K, Sakurai F, Mizuguchi H. Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells. *Int J Cancer*. 2007;121:1690-6.

Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fåhræus R. p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol*. 2002;4:462-7.

Yoshida J, Mizuno M, Fujii M, Kajita Y, Nakahara N, Hatano M, Saito R, Nobayashi M, Wakabayashi T. Human gene therapy for malignant gliomas (glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma) by in vivo transduction with human interferon beta gene using cationic liposomes. *Hum Gene Ther*. 2004;15:77-86.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 1998;92:725-34.

Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ, Muzyczka N. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther*. 1999;6:973-85.