RAFAEL BENTO DA SILVA SOARES

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VETOR ADENOVIRAL COM
PROMOTOR RESPONSÍVO AO SEU PRÓPRIO TRANGENE P53 E SUA
COMPARAÇÃO COM UM VETOR DE PROMOÇÃO CONSTITUTIVA**

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

São Paulo
2011

RAFAEL BENTO DA SILVA SOARES

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VETOR ADENOVIRAL COM
PROMOTOR RESPONSÍVO AO SEU PRÓPRIO TRANGENE P53 E SUA
COMPARAÇÃO COM UM VETOR DE PROMOÇÃO CONSTITUTIVA**

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

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Bryan Eric Strauss

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

Soares, Rafael Bento da Silva.

Construção e caracterização de vetor adenoviral com promotor responsivo ao seu próprio transgene p53 e sua comparação com um vetor de promoção constitutiva. / Rafael Bento da Silva Soares. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Bryan Eric Strauus.

Tese (Doutorado) – 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: Terapia Gênica.

Versão do título para o inglês: Construction and characterization of an adenoviral vector responsive to its own p53 transgene in a comparison with a constitutive promoter vector..

Descritores: 1. Expressão Gênica 2. Vetores 3. Neoplasias 4. Transferência de genes 5. Terapia Biológica 6. Morte Celular I. Strauus, Prof. Dr. Bryan Eric II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB028/2011

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

Candidato(a): Rafael Bento da Silva Soares.

Título da Tese: Construção e caracterização de vetor adenoviral com
promotor responsivo ao seu próprio transgene p53 e sua
comparação com um vetor de promoção constitutiva. .

Orientador(a): Prof. Dr. Bryan Eric Strauss.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24.08.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 734/06, intitulado: "Construção e Caracterização do Vetor pAdPGp14IRESp53: Um Vetor de Adenovírus Bicistrônico que Combina Ação e Regulação Gênica" apresentado pela Comissão Científica e de Ética do Incor.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dr(a): Prof.Dr. José Eduardo Krieger

Pesquisador (a) Executante: Sr(a):. Rafael bento da Silva Soares

CAPPesq, 24 de Agosto de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do
Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, pelo
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da
Universidade de São Paulo,
Apoio financeiro da Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
bolsa de doutorado-direto (DD), processo número 05/03543-9.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos principais vão a todo meu grupo do Setor de Vetores Virais, onde sempre houve muita amizade e cooperação

Agradeço inicialmente ao professor Bryan pela oportunidade que me abriu e pela confiança depositada em mim para realizar suas idéias e projetos, me treinando para atingir o meu sonho.

Também ao Márcio Bajgelman pela ajuda, treinamento e também exemplo de caráter.

Obrigado aos alunos do grupo, Paula Fratini, Vinícius Melo, Christian Merkel, Anna Carolina, Aline Hunger, Daniela Zanata, Ruan Medrano, Taynah Ibrahim e João Paulo. Novos ou veteranos, aprendi com todos. Aos novos que eu talvez tenha estragado peço desculpas.

De importância fundamental foram os amigos do laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do INCOR, também um exemplo de cooperação. Assim, obrigado professores José Eduardo Krieger, Paulo Oliveira, Alexandre Pereira, José Xavier Neto, Silvana Chiavegato e Deborah Schechtman.

Aos funcionários e amigos Renata, Maúde, Silvana, Arruda, Márcio, Marcos

Aos vários alunos que passaram por este laboratório, como Ayumi, Samanta, Daniela, Gustavo, Mariliza, Valério, Fábio, Vinícius, Juliana, Chester, Luciene, Rafael, Gabriela, Thais.

Sou grato ainda aos colegas de outros laboratórios, em especial agradeço imensamente o apoio do laboratório da professora Eugênia Costanzi-Strauss, sem o qual este trabalho teria sido muito mais complicado de ser completado. Obrigado professora Eugênia, alunos Felipe, Juliana e Bia.

Também o laboratório do professor Roger Chammas pelo uso de seus equipamentos, reagentes e discussões. Obrigado Roger, Tarcísio, Andréia, Camila, Guilherme e Lara.

Obrigado ao laboratório do professor Francisco Laurindo e aos alunos João, Leonardo, Denise, Luciana e Vitor pelo apoio constante.

Agradeço também à professora Mariz Vainzof e suas bioteristas Heloisa e Rose; e ao IPEN na pessoa de Maria Neide.

Um agradecimento especial para as amizades incríveis que levarei deste tempo conturbado, importante e único que é o doutorado. Valeu por passarem por isso comigo Zé Pereira, Cabelo-de-Fogo, Mary Jane, Boni, Gafanhota, Line, Quimi, Quito, Ally, Angel, Hoza, Marcela

Agradeço a minha família: meus pais Sérgio e Sandra, Cecília e Diana; também a minha sogra Maria Isabel e principalmente a Isabela. Tudo teria sido muito mais difícil sem vocês.

RESUMO

Soares RBS. Construção e caracterização de vetor adenoviral com promotor responsivo ao seu próprio transgene p53 e sua comparação com um vetor de promoção constitutiva. [Dissertação de Doutorado em Biotecnologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Em sua maioria, estratégias de transferência gênica utilizam arranjos com promotores e transgenes funcionando de maneira independente entre si, como é o caso do amplamente utilizado promotor CMV. Nosso grupo foge dessa linha de promotores/transgenes independentes. Desenvolvemos uma nova estratégia de transferência gênica que combina estrategicamente a atividade do transgene e o do promotor de expressão gênica, onde o promotor foi modificado com a inserção do elemento PG, responsivo a p53. Neste trabalho construímos um novo vetor adenoviral (AdPGp53) contendo o gene da proteína supressora de tumor p53 cuja expressão é controlada por ela própria através do elemento PG. Em comparação com um vetor adenoviral que possui o gene da p53 sob ação do promotor tradicional CMV (AdCMVp53), o vetor AdPGp53 apresentou expressão superior de p53 em células humanas de carcinoma de próstata PC3, maior morte celular *in vitro* e parece ter diminuído o ritmo de crescimento tumoral *in vivo* em um modelo xenográfico de células PC3 em camundongos atímicos.

Palavras-chave: Expressão gênica. Vetores. Neoplasias. Transferência de genes. Terapia biológica. Morte celular.

ABSTRACT

Soares RBS. Construction and characterization of an adenoviral vector responsive to its own p53 transgene in a comparison with a constitutive promoter vector. [Ph.D. Thesis Biotechnology]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The majority of gene therapy strategies in use today are based on promoters and transgenes that work independently, and an example of this is the widely used CMV promoter. Our group breaks way from the use of independent promoter/transgene activity. We developed a new gene transfer strategy which combines the transgene activity and the promoter of gene expression. This was achieved by the insertion of the PG element, which is a p53-responsive enhancer, in the promoter. In the present work we built a new adenoviral vector (AdPGp53) containing the p53 tumor suppressor gene, whose expression is controlled by the p53 protein itself through the PG element. In comparative experiments, in which we used our AdPGp53 vector and another adenoviral vector, with a p53 gene and a traditional CMV promoter (AdCMVp53), our vector showed superior p53 expression in PC3 human prostate cancer cells, superior cell death *in vitro* and a tendency in diminishing tumor growth in an *in vivo* xenograft model in nude mice injected with PC3 cells.

Key Words: Gene expression. Vectors. Neoplasm. Gene transfer. Biologic therapy. Cell death.

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1. Vírus produzidos e seus títulos.....	34
Quadro 2. Sequências de nucleotídeos utilizadas no RT-PCR	36
Figura 1. Ensaio <i>in vivo</i> - Regime de injeções.....	38
Figura 2. Mapa do vetor comercial pGL3 usado para amplificação do gene de luciferase.....	42
Figura 3. Mapa do vetor de transferência pENTR/TOPO-Luc	42
Figura 4. Mapa do vetor adenoviral pAdCMVLuc	42
Figura 5. Mapa do vetor de transferência pAdPGp53.	43
Figura 6. Mapa do vetor de transferência pENTR/TOPO-PGp53	44
Figura 7. Mapa do vetor adenoviral pAdPGp53	44
Figura 8. Ensaio de luciferase em células HEK293 produtoras dos vírus.	45
Figura 9. Atividade de luciferase em células PC3 transduzidas com os vírus ..	46
Figura 10. Atividade de luciferase em células transduzidas com o vírus AdPGLuc em células da linhagem DU145 e PC3pLPCp53(223).	47
Figura 11. Ensaio de cinética de expressão de luciferase.....	48
Figura 12. Efeito da transdução do vírus AdPGp53 em células DU145 e PC3...51	
Figura 13. Porcentagem de células em sub-G0, indicando morte celular.....	52
Figura 14. Análise de FACS mostrando porcentagem de células em sub-G0, indicando morte celular.	53
Figura 15. Análise de FACS mostrando morte celular com lote AdPGp53-2.	54
Figura 16. Análise de FACS mostrando morte celular com lote AdPGp53-produção 2.	55
Figura 17. Imunocitoquímica para marcação de p53.	57
Figura 18. RT-PCR de células PC3 transduzidas com vírus.....	58
Figura 19. Gráfico do crescimento tumoral nos animais injetados com vírus. .59	
Figura 20. Lâminas de tumores tratados com os vírus AdLacZ ou AdPGp53.. .61	
Figura 21. Lâminas de tumores tratados com os vírus AdLacZ ou AdPGp53.. .61	
Figura 22. Ensaio de morte celular (TUNEL).....	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 A via p53/ARF/mdm2 como alvo da inibição tumoral	15
1.1.1 Funções de p53.....	15
1.1.2 Regulação de p53 – mdm2	17
1.1.3 Ativação de p53.....	18
1.1.4 Perda da ação de p53.....	19
1.1.5 O elemento PG.....	19
1.1.6 O promotor CMV.....	20
1.1.7 Vetor adenoviral	22
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Preparação dos plasmídeos.....	29
3.2 Manutenção das linhagens celulares	29
3.3 Construção dos vetores plasmidiais	29
3.4 Produção Adenoviral	30
3.4.1 Amplificação e purificação de vírus em pequena e média escala	30
3.4.2 Transfecção com fosfato de cálcio.....	31
3.4.3 Coleta e amplificação do estoque viral	31
3.4.4 Produção e purificação viral	32
3.4.5 Titulação do estoque viral	33
3.5 Ensaios de luciferase.....	34
3.6 Ensaio de Ciclo Celular.....	35
3.7 RT-PCR.....	35
3.8 Imunofluorescência indireta em monocamada de células	37
3.9 Ensaio <i>in vivo</i> – animais e regime de injeção	37
3.10 Ensaio de morte celular em cortes histológicos - TUNEL	38
4 RESULTADOS.....	40
4.1 Construção dos vetores virais	41
4.1.1 Construção dos vetores repórteres com luciferase.....	41
4.1.2 Construção do vetor AdPGp53	43
4.2 Confirmação da atividade dos vírus repórteres AdCMVLuc e AdPGLuc	45

4.3 Ensaio repórter com p53 sensível a temperatura.....	46
4.4 Cinética da expressão do vírus AdPGp53.....	48
4.5 Ensaios de transdução de AdPGp53 - ciclo celular	49
4.6 Comparação entre o vetor com elemento PG e o vetor com promotor constitutivo – Morte Celular	53
4.7 Detecção de p53 por imunohistoquímica.....	56
4.8 RT-PCR de PC3 transduzidas com vírus.....	57
4.9 Ensaio in vivo: AdPGp53 e sua influência no crescimento tumoral.....	59
4.10 Ensaio in vivo: Análise histológica dos tumores	60
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO - ARTIGOS PUBLICADOS.....	77

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em sua maioria, estratégias de transferência gênica utilizam arranjos com promotores e transgenes funcionando de maneira independente entre si. O Setor de Vetores Virais (SVV, Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, FM-USP) foge dessa linha de promotores/transgenes independentes. O SVV criou uma nova estratégia de transferência gênica que combina estrategicamente a atividade do transgene e o do promotor de expressão gênica (Strauss e Costanzi-Strauss, 2004; Strauss et al., 2005).

O sistema desenvolvido pelo Dr. Strauss se iniciou com a construção de um vetor retroviral chamado pCLPG, onde o promotor viral foi modificado com a inserção do elemento PG, responsivo a p53. Desta forma, a expressão de um gene de interesse clonado no vetor retroviral será dirigida pela p53. Os dados obtidos com este sistema pCLPG mostram que o vetor pCLPG- Δ U3 atinge um nível de expressão sete vezes maior do que o obtido com o vetor parental pCL. Também foi demonstrado que a p53 codificada pelo próprio vetor pCLPG- Δ U3 dirige expressão viral e suprime proliferação de linhagens tumorais com níveis superiores aos vistos com o vetor parental (Strauss e Costanzi-Strauss, 2004; Strauss et al., 2005). Este arranjo emprega p53 para executar duas funções interligadas: dirigir expressão viral e agir como um supressor de tumor.

Nosso grupo também tem construído um vetor adenoviral onde a expressão do transgene é controlada por p53. Este vetor, chamado AdPG, oferece altos níveis de expressão na presença de p53 funcional (Bajgelman e Strauss, 2008). Porém, os estudos publicados com este vetor não se esgotaram. Afinal este artigo não incluiu a avaliação do desempenho do vetor AdPG quando utilizado para transferir o cDNA de p53 (ou de qualquer gene terapêutico).

Neste trabalho propomos a construção de um novo vetor adenoviral contendo o gene da proteína supressora de tumor p53 cuja expressão seja controlada por ela própria através do elemento PG. Assim, nosso vetor funcionaria da seguinte forma: transduzido para a célula alvo, a seqüência PG é reconhecida pela p53 tipo selvagem (wt), tanto endógena como a codificada pelo vírus, iniciando o sistema de feedback positivo, e passaria a expressar ativamente a seqüência p53. O p53 exógeno agiria terapeuticamente dentro de suas funções tumor-supressoras como fator de transcrição, ativando expressão de genes necessários para apoptose e

controle de proliferação. Além disto, o p53 agiria também como fator de transcrição via o elemento PG, amplificando ainda mais a expressão de p53.

Com isto pretendemos criar um vetor que seja eficaz na reparação da via de p53, podendo atingir tanto linhagens com mutações deletérias de p53 quanto linhagens que super expressem mdm2, e que tenha eficiência maior que os vetores que possuem o promotor constitutivo CMV.

1.1 A via p53/ARF/mdm2 como alvo da inibição tumoral

Como descrito a seguir, TP53 é um candidato para o tratamento de câncer devido ao seu papel central em vias de controle de proliferação e indução de morte celular. Isto se deve ao fato da proteína p53 ser 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). A p53 age também como inibidora de transcrição de uma variedade de promotores, incluindo genes que bloqueiam 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). Por isso a proteína p53 possui alto número de mutações, mais de 25000 segundo a IARC (www-p53.iarc.fr); e seus reguladores, tais como ARF e hdm2, também apresentam muitas alterações em tecidos tumorais.

1.1.1 Funções de p53

Fator de transcrição

Uma enorme quantidade de informação sobre as funções bioquímicas de p53 tem se acumulado, mas a que mais chama atenção é a sua função como fator de transcrição de outros genes. Esta ação se dá pelo fato da proteína p53 possuir um domínio de transativação e outro que pode se ligar muito fortemente a sequências

específicas de DNA (Raycroft et al., 1990; Kern et al., 1991). Esta habilidade de se ligar a regiões específicas para transativar genes é a mais afetada em cânceres com mutações em p53, por isso a região mais mutada nestes tumores é justamente este domínio de ligação de DNA (Beckerman, 2010), e a importância dessa região se confirma por ser a região da p53 mais conservada evolutivamente.

As mutações mais comuns em p53 nos tumores humanos ocorrem neste domínio de ligação entre os códons 125 e 300, sendo que os resíduos de aminoácidos de 112 a 114, 2036 a 251 e 271 a 286 são as regiões que realmente interagem com o DNA (Olivier et al., 2010), e estas mutações desestabilizam esta interação (Rolley et al., 1995; Joerger e Fersht, 2007).

Mas mutações em outras regiões podem também dificultar esta interação, como por exemplo o segmento entre os aminoácidos 163 e 195, que são importantes para manter a estrutura terciária de p53 e que uma vez alterada pelas mutações podem desestabilizar o complexo p53-DNA (Rolley et al., 1995; Joerger e Fersht, 2007).

Dezenas de genes tem sido identificados como alvos transcricionais de p53, sendo a maioria deles ligados ao controle de ciclo celular e apoptose, com é o caso do gene da proteína p21, uma inibidora de quinases dependentes de ciclina (el-Deiry et al., 1993), e da proteína pro-apoptótica BAX (Miyashita e Reed, 1995), exemplos clássicos da ativação transcricional por p53.

A lista de genes que tem sua transcrição controlada por p53 não pára de crescer, e recentemente foram adicionados os microRNA, na sua maioria os pertencentes à família miR-34 (Hermeking, 2007), sendo que a p53 é responsável pela transcrição do microRNA e assim, por meio dele, passa a controlar indiretamente o silenciamento no nível traducional de outras proteínas.

E não só a ativação transcricional é observada, como a p53 também pode reprimir diretamente a expressão de alguns genes, como é o caso da bloqueadora de apoptose Bcl-2 (Miyashita et al., 1994) ou os genes de resistência a quimioterápicos MDR1 (Chin et al., 1992). Esta repressão da expressão se dá pela ligação da p53 diretamente ao promotor do alvo ou por interação proteína-proteína.

Função citoplasmática

As interações proteína-proteína de p53 foram evidenciadas por trabalhos que, por exemplo, utilizavam proteínas p53 ineficientes como ativadores de transcrição ou drogas que inibiam esta função, mas ainda sim observaram indução de apoptose (Chipuk et al., 2003). Assim a apoptose independente de transcrição foi estabelecida e vários alvos protéicos de p53 foram encontrados. O mais clássico é a família Bcl2 que possui proteínas pró e anti-apoptóticas que se ligam diretamente a p53 que, por esse mecanismo, controla a permeabilização da membrana mitocondrial. Ainda há outros efeitos de p53 independentes de transcrição, tais como inibição de autofagia e duplicação de centróssomo (Green e Kroemer, 2009).

1.1.2 Regulação de p53 – mdm2

A interação proteína-proteína mais importante na via de regulação de p53 talvez seja a sua interação com a mdm2 (também chamada de hdm2 para a proteína humana). Mdm2 se mostrou uma forte inibidora da atividade de p53, e ela faz isto de várias maneiras como, por exemplo, ligando-se ao domínio de transativação de p53 e impedindo que ela exerça sua ação como fator transcricional (Oliner et al., 1993). Além disso, por ser uma ligase de ubiquitina, a mdm2 promove a ubiquitinação de p53, e este processo de ubiquitinação transforma a proteína p53 em um alvo para a degradação proteossomal (Haupt et al., 1997).

Interessante notar que a mdm2 tem como fator de transcrição a própria p53, formando assim um feedback negativo onde p53 ativa transcrição de mdm2 que por sua vez degrada p53. Assim, mdm2 atua como a principal reguladora negativa de p53, mantendo os níveis desta baixos enquanto a célula está em condições normais.

Outra proteína se mostrou importante nesta regulação negativa, chamada mdmX (ou mdm4), esta proteína não tem função de ligase de ubiquitina, mas atua na degradação de p53 dimerizando com mdm2 e aumentando a atividade de ligase desta com p53 (Shvarts et al., 1996). Mediante estas duas proteínas reguladoras, a meia vida da p53 é curta, de 6 a 20 minutos apenas.

1.1.3 Ativação de p53

Mas diante de alguns sinais de estresse a regulação de p53 se altera, ela se torna estável e ativa, livre da degradação induzida por mdm2. Esta ativação de p53 é produto de diferentes tipos de estresses, tais como dano por UV, por radiação gama, por temperatura, mutações e ativações de proto-oncogenes, ação de radicais livres, hipóxia, entre outros. A resposta para todos estes danos passa pela regulação de p53. Esta variedade dos tipos de estresse gera danos também variados, como quebra na dupla fita, dímeros de timina, desregulação do ciclo celular, que por sua vez sinalizaram por vias distintas umas das outras, ativando fosfatases, acetilases, desacetilases, entre outras. Mas toda esta variedade de sinais e ativações tem como alvo em comum a ativação de p53. Alterações diversas, como fosforilação, metilação, acetilação, ubiquitinação e sumonização são as responsáveis pela estabilização e ativação de p53 para que exerça suas diversas funções já descritas (Meek, 1999; Lavin e Gueven, 2006). Tomando a radiação UV como exemplo, descobriu-se que células submetidas a esta radiação acumulam p53 numa velocidade que não permitiria que fosse em resposta a um aumento da transcrição de p53, ou seja, esta resposta só seria possível pela estabilização das proteínas de p53 já presentes na célula. Os efeitos causados pela radiação UV geram dímeros de timina que são detectados e ativam a proteína ATR. ATR fosforila p53 na posição Ser15 e também a proteína Chk1 (Tibbetts et al., 1999; Guo et al., 2000), sendo que esta também fosforila p53 na posição Ser20. Estas fosforilações fazem com que p53 perca afinidade pela mdm2 e ative sua ação transcricional aumentando sua afinidade por cofatores (como p300), deixando-a protegida da degradação e livre para interagir com seus alvos (Dornan e Hupp, 2001).

Existe portanto uma rede de ativação e regulação muito complexa e ampla em torno da p53, tanto pela variedade de estímulos intra e extra celular, passando pelas moléculas mediadoras deste sinal, até chegar aos diversos pontos de ativação da própria proteína p53 ou às suas reguladoras diretas, como mdm2 e ARF.

1.1.4 Perda da ação de p53

Mutações no gene que produz a proteína p53 são as alterações mais comuns de câncer humanos (Hollstein et al., 1991). Elas ocorrem em quase todos os tipos de câncer, com taxas que variam de 50 a 5% dependendo do tipo tumoral (Olivier et al.). As mutações são mais comuns em estados mais avançados ou em subtipos mais agressivos de câncer (Wang et al., 2004) (Langerod et al., 2007) e em cânceres com baixas taxas de mutação, a p53 é inativada por mecanismos alternativos, tais como degradação direta de proteínas virais (Tommasino et al., 2003) ou superexpressão de seus reguladores, como em sarcomas que apresentam quantidade elevada de hdm2.

Esta grande presença de alterações de p53 em cânceres se deve justamente ao fato dela ser o ponto de convergência de várias vias importantes que atuam no reconhecimento de danos e nas respostas a este dano.

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 não controlada e relativamente resistente para 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 como uma esperança no tratamento do câncer

1.1.5 O elemento PG

Um dos primeiros exemplos da interação de p53 com uma sequência específica de DNA foi demonstrado por Kern e colaboradores (Kern et al., 1991). A proteína p53 purificada foi misturada com fragmentos randômicos de DNA, previamente radio-marcados, e o complexo imunoprecipitado. Uma sequência

derivada do *Ribosomal Gene Cluster* foi identificada como capaz de interagir com p53 de maneira sequência-específica (Kern et al., 1991). Num trabalho posterior, este mesmo grupo associou a sequência identificada, agora denominada PG, com um promotor mínimo derivado do vírus de políoma e o gene repórter CAT (cloramfenicol acetiltransferase). Quando o vetor PG-CAT e um vetor expressando p53 selvagem foram co-transfectados em células HCT 116, a atividade de CAT foi detectada, o mesmo não ocorreu na ausência de p53 ou na presença de p53 mutado. Este grupo montou o vetor PG-CAT contendo entre 0 a 16 cópias do elemento PG e demonstrou que na presença de p53 selvagem a atividade do repórter era proporcional ao número de repetições da sequência PG (Kern et al., 1992). Em nossos trabalhos, o elemento PG foi isolado do vetor PG13-CAT cedido por Martin Haas da Universidade da Califórnia, San Diego e a ele ainda foram adicionados dois elementos para aumentar sua eficiência, a sequência Tx (o TATA box do gene E1B do adenovírus (Xavier-Neto et al., 1998)) e o intron da β -globina de coelho, formando o promotor PGTx β . Este vetor mostrou forte atividade transcricional, como foi mostrado em trabalho realizado em nosso laboratório quando foi utilizado um vetor com o elemento PG comandando a expressão do gene repórter luciferase (AdPGLuc). Este vetor mostrou atividade 700 vezes maior na presença de p53 selvagem em comparação com células com p53 mutantes (Bajgelman e Strauss, 2008).

1.1.6 O promotor CMV

O promotor CMV talvez seja o mais utilizado em construções de vetores de transferência gênica nos dias de hoje. Isto se deve a sua ampla atividade entre espécies de mamíferos, expressão em diferentes tipos celulares e tecidos, e alto nível de expressão de seus produtos.

Este promotor nada mais é do que um promotor-*enhancer* isolado de um gene *immediate early* do citomegalovírus humano (Boshart et al., 1985). O citomegalovírus humano é um membro da família herpes-vírus e possui um *enhancer* formado por algumas sequências repetitivas que interagem com diferentes fatores de transcrição, tais como os das famílias do fator nuclear κ B (NF- κ B), fator

nuclear 1(NF-1), *cAMP response element-binding* (CREB), ativador de proteína 1 (AP-1), ácido retinóico (RA), proteína de ligação a DNA metilado (MDBP) e outros (Nelson et al., 1987; Sambucetti et al., 1989; Zhang et al., 1991; Ghazal et al., 1992; Wade et al., 1992; Rideg et al., 1994; Kim et al., 2007; Isern et al., 2010).

Pelo fato de interagir com diferentes fatores de transcrição, a atividade do promotor CMV é ampla, como foi mostrado, por exemplo, em estudos de transferência gênica *in vitro* em diferentes tipos celulares, *in vivo* injetado em diferentes tecidos, e em construção de transgênicos que possuíam um gene repórter sob comando do promotor CMV, mostrando a expressão do gene repórter em todos os tecidos de camundongos (Furth et al., 1991; Cheng et al., 1993; Cheng et al., 2004).

Diversos estudos mostraram que este promotor é um dos mais confiáveis em termos de amplitude de aplicação e de maior nível de expressão em comparação com outros promotores muito utilizados, como o do vírus símio 40 (SV40), do vírus de Sarcoma de Rous (RSV), do vírus da leucemia murina (MLV) entre outros (Qin et al., ; Cheng et al., 1993; Xu et al., 2001; Garmory et al., 2003; Zheng e Baum, 2005).

Mesmo tendo expressão detectável em uma grande quantidade de tipos celulares, os níveis dessa expressão podem variar muito, o que pode fazer com que o CMV tenha expressão menor que outros promotores mais “especializados” em alguns destes tipos celulares (Fitzsimons et al., 2002).

Outra limitação deste promotor é a queda que ocorre quando se analisa sua expressão a longo prazo. Esta baixa na expressão ocorre principalmente de duas maneiras: como consequência da resposta imune e por silenciamento epigenético do promotor. A resposta imune celular, que pode ser gerada pelo transgene e/ou pelo próprio vetor de transferência gênica, induz a expressão de citocinas e quimioquinas como o interferão-gama (INF γ), que diminui a atividade de CMV, e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) que, dependendo do tipo celular, pode

aumentar ou diminuir a atividade deste promotor (Harms e Splitter, 1995; Ritter et al., 2000).

Os mecanismos epigenéticos também atuam no silenciamento do promotor CMV através de extensa metilação do DNA de sítios CpG e não-CpG e desacetilação de histonas H3 e H4 (Murphy et al., 2002; Brooks et al., 2004).

Estes mecanismos de silenciamento acabam tornando o promotor CMV uma escolha não muito boa quando a intenção é ter expressão a médio ou longo prazo, como por mais de 3 semanas, mas ainda sim é um dos vetores de maior expressão quando se espera uma forte resposta a curto prazo (Chen et al., 2008).

1.1.7 Vetor adenoviral

Vários são os motivos para se utilizar vetores recombinantes derivados do adenovírus (Ad) como vetor de transferência gênica: ele pode gerar grandes 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; 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; possui um forte tropismo por células cancerosas, tornando-o assim um ótimo vetor para a terapia gênica de câncer.

Existem aproximadamente 50 sorotipos de adenovírus divididos em 6 subgrupos de A a F de acordo com o tamanho de seu genoma, sua composição, homologia e organização. O subgrupo C, com os sorotipos 1,2,5 e 6 é o mais estudado e conhecido. Os vetores usados em transferência gênica são derivados tipicamente do sorotipo 5 (Ad5).

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 capsídio. 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 (early) e os na fase posterior de L (late).

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.

Os genes L, que iniciam sua transcrição depois da replicação do DNA viral, são responsáveis pela estrutura protéica 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 dentro 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.

No entanto, vetores adenovirais recombinantes possuem deleções que o impedem de se replicar em qualquer tipo celular. O vetor do sistema ViraPower[™] da empresa Invitrogen, construção da qual foram gerados os vetores, possui a região E1 e E3 deletadas. A maneira usada para a produção de vírus utiliza uma estratégia de amplificação do estoque viral que começa com a transfecção da construção adenoviral em células que possuam E1. As células utilizadas em nosso laboratório são células embrionárias de rim humano (HEK 293) que produzem E1, complementando vetores deletados nessa região. Assim, Ad produzidos em HEK 293 podem infectar outras células, mas não podem replicar-se se essas células não expressam E1. A região E3 que também é deletada nos vetores recombinantes não é essencial para a produção e atividade viral e ainda assim são responsáveis por parte da resposta imune gerada pelo vetor, por isso sua eliminação do sistema de produção é interessante.

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 seqüências homólogas presentes no Ad recombinante e no genoma da célula HEK 293, devolvendo ao vetor adenoviral a seqüência E1, que o tornaria replicante novamente.

Outro problema que pode ser enfrentado na utilização de Ad é uma significativa resposta imune quando utilizado *in vivo*, podendo gerar inflamação. Também existe a possibilidade do organismo infectado produzir anticorpos anti-Ad reduzindo a eficiência da transferência, principalmente quando o tratamento exige várias aplicações de vírus, pois neste caso, as injeções subseqüentes podem sofrer com a resposta imune disparada pelas primeiras aplicações.

Apesar disto, este é o vetor viral mais utilizado para terapia gênica, sendo usado em 400 testes clínicos no ano de 2010, correspondendo a mais de 23% de todos os vetores usados em testes clínicos (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Montar um vetor adenoviral (AdPG) com expressão controlada por p53, de maneira análoga com o sistema pCLPG (Strauss e Costanzi-Strauss, 2004; Strauss et al., 2005), com a vantagem do adenovírus ser um vetor mais potente do que o retrovírus. Além disso, nós pretendemos colocar o cDNA de p53 no vetor AdPG, criando os vetores necessários para comparar a eficiência de expressão e inibição tumoral oferecido pelo sistema AdPG em comparação ao sistema sob controle do promotor constitutivo CMV, ambos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Montagem do vetor AdPG:

Inserir o promotor quimera PG-Tx- β no vetor pAd-promoterless (pAdPG);

Inserir o gene repórter Luciferase no vetor pAdPG (pAdPGLuc) e validar a expressão controlada por p53;

- Inserir o cDNA de p53 (pAdPGp53);

Transferência das construções para kit ViraPower Gateway;

Validar/caracterizar expressão dos transgenes.

- Produção de vírus:

Amplificação e purificação de vírus em pequena e média escala;

Titulação de estoques virais;

- Caracterização funcional *in vitro*:

Ensaio de imunocitoquímica, RT-PCR, ciclo celular;

Ensaio de ciclo celular para medir alteração em proliferação e/ou indução de morte celular em linhagens celulares de carcinoma da próstata humana;

- Caracterização funcional *in vivo*:

Padronização das injeções de células e de vírus em modelo animal

Medição dos tumores e acompanhamento de seu crescimento

Coleta de tumores para análise histológica, imunohistoquímica, TUNNEL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação dos plasmídeos

Os plasmídios foram preparados inicialmente utilizando o Plasmid Midi Kit fornecido pela Qiagen. A concentração final de cada preparação foi determinada através de leitura espectrofotométrica a 260 e 280nm. A identidade de cada vetor foi confirmada através de mapa de restrição obtido após o tratamento dos plasmídios com enzimas de restrição específicas e separação em gel de agarose em eletroforese, seguindo protocolo clássico descrito por Sambrook et al. (1989).

3.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens HEK293 derivada de células de rim embrionário humano imortalizada com adenovírus e fornecida no Kit AdenoVator; DU145, derivada de tumor de próstata humana com p53 mutante, e PC3, derivada de tumor de próstata humana p53 deletado, foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal Hyclone Defined, (Hyclone, Logan Utah, USA), 100 µg/mL de gentamicina, 50 µg/mL de ampicilina e 2,5 µg/mL de Fungizona (anfotericina B). Todas as linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

3.3 Construção dos vetores plasmidiais

Durante a realização das etapas de clonagem para a construção dos vetores, utilizaram-se técnicas rotineiras de DNA recombinante conforme descrito em Sambrook et al, 1989. A digestão enzimática seguiu as recomendações do fabricante, bem como o tratamento com fosfatase alcalina (CIAP), reação de fill in (com T4 DNA polimerase) e ligação (T4 DNA ligase).

Para a transferência das construções do antigo sistema ViraPower da empresa Q-Biogene para o novo sistema Gateway da empresa Invitrogen, foram desenhados iniciadores que flanqueiam as regiões de interesse para a sua amplificação (Tabela 1). Estes iniciadores possuem uma bandeira para inserção direcional de seus produtos no vetor pentr/TOPO cedido pelo kit Gateway. Estes vetores pentr/TOPO com os produtos de PCR inseridos, chamados de vetores de transferência, são usados por sua vez em uma reação de recombinação homóloga juntamente com um vetor Gateway de destino. Este sim, possuindo os genes adenovirais e prontos para a produção viral.

Após a clonagem, as novas construções foram analisadas, por mapa de restrição, PCR e ensaios de expressão transiente. Todos os clones bacterianos contendo sub-clones intermediários ou construções finalizadas foram guardados em estoque de glicerol, mantidos a -70 °C.

3.4 Produção Adenoviral

3.4.1 Amplificação e purificação de vírus em pequena e média escala

De posse dos vetores TOPO de transferência citados acima, o próximo passo é recombinar estes vetores com os vetores de destino que possuem as sequências do adenovírus. Foram utilizados dois vetores de destino: pAd/CMV/V5-dest e pAd/PL-dest (Invitrogen). O primeiro contém promotor CMV e sinal de poliadenilação (pA), enquanto que o segundo não possui promotor nem sinal pA. Os vetores TOPO que possuem o elemento PG são inseridos no vetor sem promotor pAd/PL-dest. Já o vetor TOPO/Luc será inserido no vetor de destino pAd/CMV/V5-dest.

Uma vez que a recombinação tenha sido feita e confirmada, o DNA adenoviral recombinado é utilizado para transformar bactérias da linhagem DH5a, uma cepa que não promove recombinação, podendo ser amplificado e purificado.

Tendo em mãos o DNA adenoviral completo e purificado, ele deve ser linearizado com a enzima PacI, de modo a expor suas extremidades ITR, para só

então passar-se à fase de transfecção deste DNA em células HEK 293 para produção viral.

3.4.2 Transfecção com fosfato de cálcio

A transfecção do DNA viral recombinado foi feita por precipitação com cálcio-fosfato em células 293A mantidas em meio DMEM com 10% de soro de bezerro bovino. Protocolo adaptado de Naviaux et al. (1996). Foram semeadas, com 24h de antecedência, $7,5 \times 10^5$ células da linhagem HEK293 para transfecção em placas 6,0 cm conforme a quantidade de DNA indicada nos ensaios. O DNA foi misturado em 500 μ L de cloreto de cálcio 0.25M, e precipitado com a adição de 500 μ L do tampão fosfato de sódio/HEPES HBS-2x pH 7,05 (cloreto de sódio 274mM, HEPES 40mM, fosfato monoácido de sódio 2,8mM), sob agitação. A suspensão contendo o precipitado de DNA foi gotejada sobre o meio de cultura das células plaqueadas, seguindo-se incubação por 4h. As células foram submetidas a um tratamento com PBS-1x contendo 15% de glicerol (choque de glicerol) durante 3 minutos, lavadas com PBS-1x e, a seguir, adicionou-se meio DMEM com 10% de soro bovino. Vinte e quatro horas após o início da transfecção as culturas tinham o meio trocado por DMEM com 2% de soro e esperou-se entre 4 e 10 dias até o aparecimento do Efeito Citopático (CPE), quando então são recolhidos o sobrenadante e as células, e congelados a -70 °C.

As partículas virais poderão ser coletadas quando forem observadas as alterações fenotípicas características do efeito citopático (saturação da célula por partículas virais) por toda a placa (4 a 10 dias). Os vírions são liberados das células por choque térmico e coletados, tomando-se o cuidado de se livrar dos restos celulares por meio de centrifugação e coleta do sobrenadante. Este sobrenadante é que será o estoque viral da primeira amplificação.

3.4.3 Coleta e amplificação do estoque viral

O sobrenadante e as células recolhidas após a transfecção passam por três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C, para lisar as células e liberar as partículas virais. Este lisado é então centrifugado a 1000 rpm por 5 min. para descarte das células, e o sobrenadante restante é alicotado e guardado a -70 °C. Este estoque é chamado de 1ª coleta.

Para amplificar os estoques virais, usa-se uma placa de 3,5cm previamente plaqueada com $2,5 \times 10^5$ células HEK293, retira-se o meio e acrescenta-se 500µL da 1ª coleta viral mais 500µL de meio DMEM com 2% de soro, deixando em estufa. Após 4hs troca-se o meio com DMEM 2% de soro e espera-se entre 4 e 10 dias pelo CPE. A coleta é feita da mesma maneira descrita acima. Este estoque viral é chamado 2ª coleta.

Ciclos como este são realizados repetidas vezes utilizando sempre a última coleta como inóculo em placas com HEK293, afim de aumentar a concentração e a quantidade dos vírus. A 2ª coleta é usada para transduzir outra placa 3,5cm com $2,5 \times 10^5$ células, gerando a 3ª coleta, que por sua vez serve de inóculo para uma placa 6,0cm plaqueada com $7,0 \times 10^5$, gerando a 4ª coleta. Esta 4ª coleta que serve de inóculo para a placa 10cm plaqueada a $1,5 \times 10^6$, originando a 5ª coleta, a ser chamada de “estoque viral” que é utilizado na produção viral.

3.4.4 Produção e purificação viral

A produção e purificação dos adenovírus construídos seguiram as instruções do protocolo do kit de purificação Adeno-Xtm, do fabricante BD Biosciences. Este sistema de purificação consiste em três passos principais:

- Amplificação: foram transduzidas com vírus 24 placas 15cm com a linhagem HEK293, com confluência entre 80 e 85% cada. O inóculo utilizado foi a 5ª coleta de cada vírus (descrita acima). A coleta da amplificação é feita entre 2 e 3 dias quando quase todas as células estão boiando ou arredondadas devido ao CPE.

Células e sobrenadante foram coletados e centrifugados a 2500rpm/ 10min, descartado o sobrenadante e ressuspensas as células em PBS, para um volume final de até 20ml e mantidas a -20 °C até purificação.

Purificação por cloreto de cézio: Células foram congeladas a -70 °C em gelo seco e metanol (ou etanol), descongeladas em banho 37 °C e vortexadas 30 segundos após cada descongelamento. Repete-se este passo por 4 ou 5 vezes. Centrifuga-se a 2500rpm/10min, coleta-se sobrenadante e descarta-se o pellet. Este é o chamado Crude Viral Lysate (CVL) e é guardado a -70 °C.

Em um tubo de ultracentrífuga Beckman 38ml (esterilizado previamente com álcool e lavado com trisHCl) são adicionados 8ml de CsCl densidade 1,4g/mL e cobertos lentamente com 6ml CsCl 1,2g/mL. É então adicionado o CVL e completado o volume para 20ml com 10mM trisHCL pH7,9. Centrifuga-se por 90min a 4 °C e a 23000rpm (rotor SW28 Beckman)

Retira-se a banda viral com agulha (G18 ou G19), cuidadosamente atravessando a parede do tubo logo abaixo da banda viral e dispensa-se o conteúdo da seringa em um tubo de centrifugação (16x76mm próprios para selar). Cobre-se com CsCl 1,33g/mL e centrifuga-se por 18 horas a 15 °C e a 46000rpm – rotor 70Ti.

Após centrifugação, retira-se a banda viral com agulha 18G e transfere-se o vírus para o cassete de membrana (Pierce slide-a lyser cat#66425) que passará por diálise por duas vezes em 500mL/30min e mais 3 vezes em 1L/1h no tampão de diálise (10mM trisHCl pH8.0/ 2mM MgCl₂/ 5% sacarose). O vírus é então coletado e armazenado a -70 °C.

3.4.5 Titulação do estoque viral

Para a titulação dos estoques virais foi utilizado o kit comercial Adeno-X Rapid Titer Kit da empresa Clontech.

O protocolo consiste em diluições seriadas do estoque viral, transdução destas diluições em células HEK 293, fixação destas células e marcação usando anticorpos primários específicos para a proteína hexon adenoviral e secundários conjugados com *horseradish* peroxidase que deixa a célula que está produzindo o vírus com uma coloração escura, possibilitando a contagem. Por este método o título é dado em partículas formadoras de colônias por mL (pfu/mL) os vírus utilizados neste trabalho atingiram os títulos indicados no quadro 1.

Quadro 1 – Vírus produzidos e seus títulos

Vírus	Título (em pfu/mL)
AdPGp53-1	$1,3 \times 10^9$
AdPGp53-2	$7,8 \times 10^{10}$
AdPGp53-3	$9,5 \times 10^{10}$
AdCMVp53	2×10^{11}
AdLacz	$3,7 \times 10^{10}$
AdGFP	$4,6 \times 10^{10}$
AdCMVLuc	1×10^8
AdPGLuc	$2,9 \times 10^8$

3.5 Ensaios de luciferase

Para a análise de luciferase, foram plaqueadas células PC3 parentais em placas 6-poços ($2,5 \times 10^5$ céls por poço) e co-transfectadas em duplicata no próximo dia pelo método de fosfato de cálcio utilizando-se 8µg do vetor TOPO/PGLuc (figura 8) ou co-transduzidas com o vetor AdPGLuc no m.o.i. indicado (figuras 9, 10 e 11) como repórteres da interação com o plasmídeo ou com o vírus, dependendo do

experimento indicado. Esperma de salmão foi usado para completar a quantidade de DNA usado na transfecção que no caso foi de 10µg totais por poço.

Após o tempo indicado as células foram lavadas com PBS e resuspendidas em 100µL de fosfato de potássio 100mM (pH 7,8), 1mM EDTA e lisadas por três ciclos de congelamento/descongelamento. O lisado das células foi incubado com substrato reagente à luciferase, LAR (Promega, USA), e as unidades relativas de luminescência de cada amostra foi determinada em luminômetro Monolight 2010.

3.6 Ensaio de Ciclo Celular

As células tripsinizadas nos tempos indicados nos resultados foram fixadas em etanol 70%, lavadas com PBS e incubadas com iodeto de propídeo (20µg/ml) em RNase A (40µg/ml) e 0,1% Triron X-100 em PBS por 30 minutos a 37 °C. Após lavagem com PBS as células foram analisadas por citometria de fluxo (FACScan, Becton-Dickenson, USA).

3.7 RT-PCR

O RNA total foi extraído utilizando o Reagente de *Trizol* conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA extraído foi verificada em gel de agarose através da visualização das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S e ausência de degradação.

Para a transcrição reversa foram usados 2µg do RNA, 250ng de hexâmeros randômicos, 1µL de dNTP 10mM e água DEPC para um total de 12µL finais. Um controle negativo é feito sem RNA. Amostras são então esquentadas a 65 °C por 5 minutos e imediatamente colocadas no gelo por mais 5 min. Adiciona-se 4µL de tampão *First Strand Buffer* (Invitrogen) e 2µL de DTT 0,1M (Invitrogen). Incuba-se em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida a 37 °C por 2 minutos. Adiciona-se 1µL de transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (M-MLV 200 unidades /µL, Invitrogen) e incuba-se a 37 °C por uma hora e inativa-se por calor

a 70 °C por 15 minutos. Estas amostras são diluídas 1:1 em água e armazenadas como estoque.

Para o PCR usa-se 1uL do estoque de amostras, 1uL de cada oligonucleotídeo (*reverse e forward*) a 50 pmol/uL, 1uL MgCl₂ a 50mM, 2,5uL de tampão de PCR 10x, 0,5uL (2,5 unidades) de Taq polimerase Platinum (Invitrogen) e água para 25uL. Para os ciclos de amplificação foram usados os seguintes tempos e temperaturas: 95 °C por 3min.; 25 ciclos de 95 °C por 1min., 57 °C por 1min., 72 °C por 1min.

PCR foi analisado em gel de agarose 1,3% e fotografado.

Quadro 2 – Sequências de nucleotídeos utilizadas no RT-PCR

Proteína referente	Sequência de oligonucleotídeos
P53	5'– GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT– 3' Forward 5' – GGG AGA GGA GCT GGT GTT GTT – 3' – Reverse
P21	5' – GAA CTT CGA CTT TGT CAC CG – 3' – F 5' – TCC TCT TGG AGA AGA TCA GC – 3' – R
Hdm2	5' – GTG CAA TAC CAA CAT GTC TG – 3' – F 5' – GAA GAT GAA GGT TTC TCT TC – 3' – R
PUMA	5' – GGA GCA GCA CCT GGA GTC – 3' – F 5' – TAC TGT GCG TTG AGG TCG TC – 3' – R
bax	5' – CCC TTT TGC TTC AGG GTT TC – 3' – F 5' – TCT TCT TCC AGA TGG TGA GTG – 3' – R
Bcl-2	5' – GAG GAT TGT GGC CTT CTT TG – 3' – F 5' – ACA GTT CCA CAA AGG CAT CC – 3' – R
B-act	5' – GCA AGA GAG GTA TCC TGA CC – 3' – F 5' – CTC TTT GAT GTC ACG CAC GA – 3' – R
E2F	5' – CTT CTA GCT CTG GGG TCT GG - 3' – left 5' – ATG CAC ACA CAC ATG CTC AC - 3' - right

3.8 Imunofluorescência indireta em monocamada de células

As lamínulas contendo as células aderidas foram submetidas ao protocolo de imunohistoquímica indireta de fluorescência seguindo o protocolo abaixo. À imunofluorescência foi associada a coloração de núcleos por Hoechst 33258.

Lamínulas foram lavadas em PBS, 3 vezes de 5 minutos, e fixadas com PFA 4% por 10 minutos a 4 °C. Puderam ser então permeabilizadas em solução de PBS mais nonidet P4 0,1% por 30 minutos a 37 °C com posterior lavagem em PBS (3 vezes por 10 minutos cada). O bloqueio é feito com solução de PBS + albumina 1% a 37 °C por 30 minutos seguida de mais uma lavagem (2 vezes, 5 minutos cada).

O anticorpo primário anti-p53 utilizado foi p53 Ab-3-camundongo (Oncogene) diluído 1:1000 e foi incubado em solução PBS mais albumina 1% a 37 °C por 60 minutos e lavado com PBS, 4 vezes por 10 minutos cada.

A incubação com anticorpo secundário (Alexa Fluor 555 coelho anti-camundongo, Invitrogen) se deu diluída em PBS por 90 minutos a 4 °C, em câmara escura seguida de nova lavagem em PBS, 5 minutos.

A incubação com *Hoechst* 33258 para marcação dos núcleos foi feita com 20 µg/ml diluído em tampão de citoesqueleto por 30 minutos e lavada em PBS, 3 vezes 10 minutos cada. Lamínulas podem então ser montadas em lâminas de vidro e fixadas com esmalte. Guardadas ao abrigo da luz a 4 °C.

3.9 Ensaio *in vivo* – animais e regime de injeção

Para os ensaios *in vivo* de crescimento tumoral utilizamos um modelo xenográfico em camundongos atímicos NUDE/Balb-c. Estes animais com idades de 12 semanas foram injetados com 2×10^6 células PC3 subcutaneamente no dorso. Assim que os tumores atingiram um tamanho em torno de 60 mm^3 foi iniciada a sequência de injeções virais onde dois vírus foram testados: AdLacZ e AdPGp53. Foram injetadas 3×10^8 partículas virais por injeção.

O volume tumoral foi calculado segundo a fórmula $\frac{1}{2} \times (\text{diâmetro maior}) \times (\text{diâmetro menor})^2$ (Tomayko e Reynolds, 1989). Os tumores levaram de 3 a 6 semanas para atingirem os 60mm³ para início do tratamento.

Figura 1. Ensaio *in vivo* - Regime de injeções. Modelo xenográfico de camundongos nude/Balb-c. Foram injetadas 2×10^6 células por animal subcutaneamente, num volume em PBS de 100uL. Cada injeção viral contém 3×10^8 partículas virais em 100uL de PBS

Cada injeção foi dada em pelo menos dois quadrantes do tumor para otimizar o alcance do vírus.

No dia 9 após a primeira injeção, os tumores foram medidos e os animais sacrificados para coleta. Estes tumores foram fixados em paraformaldeído 4% (PFA 4%) por 24 horas e então emblocados em parafina.

3.10 Ensaio de morte celular em cortes histológicos - TUNEL

O ensaio de TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, utilizando o In Situ Cell Death Detection Kit, foi realizado conforme instruções do fabricante. Este método cora o núcleo de células com DNA fragmentado por meio da incorporação de nucleotídeos marcados com fluoresceína no OH livre da porção terminal 3' fragmentada. A visualização pode ser realizada diretamente no microscópio de fluorescência ou ainda após utilização de um anticorpo secundário anti-fluoresceína conjugado à fosfatase alcalina. Os tecidos parafinados, cortados a 3um de espessura submetidos à reação de TUNEL depois de revelados para fosfatase alcalina com fast red por 20 minutos e contra-corados

com hematoxilina de harris por 1 minuto, foram montados em meio aquoso e analisados em microscópio de luz.

4 RESULTADOS

4.1 Construção dos vetores virais

Os primeiros vetores adenovirais construídos no laboratório e que serviram de base para a construção dos vírus utilizados nesse trabalho foram construídos no sistema comercial AdenoVator, da empresa Qbiogene. Vírus foram produzidos e titulados, mas no momento de serem testados não apresentaram expressão satisfatória de seus transgenes. Mesmo seus plasmídeos foram testados e apresentaram expressão, mas os vírus não. Optamos por transferir os vetores para o sistema Gateway da empresa Invitrogen, estratégia que contornou o problema do sistema antigo.

4.1.1 Construção dos vetores repórteres com luciferase:

Os primeiros vetores a serem construídos foram os que possuem o gene repórter luciferase. São eles: AdCMVLuc e AdPGLuc. O vetor AdPGLuc já existia em nosso laboratório e seu vetor de transferência, pEntr-TOPO-PGLuc foi usado como base para a clonagem de outros vetores com o elemento PG por clonagem tradicional.

A construção pAdCMVLuc foi gerada a partir de produto de PCR do vetor pGL3 (Promega) utilizando os seguintes iniciadores:

Forward - 5' caccgcatctaagtaagcttggc 3'

Reverse- 5' cttatcatgtctgctcgaag 3'

Esta reação de PCR gerou como produto o gene da luciferase e mais uma marcação (bandeira) contida nos próprios iniciadores. Esta bandeira permite recombinação na orientação certa dentro do vetor de transferência pENTR/TOPO-Luc, que posteriormente foi recombinado no vetor de destino pAd/CMV/V5-dest (Invitrogen). Para tanto foi realizada uma reação de recombinação, seguindo protocolo cedido pelo kit Gateway.

Figura 2. Mapa do vetor comercial pGL3 usado para amplificação do gene de luciferase

Figura 3. Mapa do vetor de transferência pENTR/TOPO-Luc

Figura 4. Mapa do vetor adenoviral pAdCMVLuc

4.1.2 Construção do vetor AdPGp53

O vetor pAdPGp53 (no sistema Adenovator) foi obtido partindo do vetor pAdPGLuc, já disponível em nosso laboratório, digerido com as enzimas HindIII e XhoI para retirada do cassete β -Luc-pA-, resultando o vetor pPGTx H/X, o qual foi isolado em gel de agarose. O fragmento β -p53- foi retirado do vetor pPGTx β p53(Arg) (pelo colega Márcio Bajgelman, SVV, InCor, FM-USP) também com HindIII e XhoI e isolado em gel. O vetor pAdPGTx H/X foi ligado com o inserto β -p53- H/X originando o pAdPGp53 (figura 5). A transferência deste vetor para o sistema Gateway foi feita pela amplificação do cassete de expressão PGp53 com iniciadores flanqueando este cassete do pAdPGp53 e inseridos no pentr/TOPO, gerando o vetor de transferência pENTR/TOPO-PGp53. Este vetor foi utilizado na reação de recombinação do kit Gateway com o vetor de destino sem promotor pAdeno/PL-dest, gerando a construção pAdPGp53 (figura 7). Esta por sua vez foi utilizada para produção do vírus AdPGp53.

Figura 5. Mapa do vetor de transferência pAdPGp53(AdenoVator, Q-Biogene). Setas indicam localização dos iniciadores de PCR para transferência ao sistema Gateway.

Figura 6. Mapa do vetor de transferência pENTR/TOPO-PGp53

Figura 7. Mapa do vetor adenoviral pAdPGp53

4.2 Confirmação da atividade dos vírus repórteres AdCMVLuc e AdPGLuc

Os vírus repórteres AdCMVLuc e AdPGLuc foram construídos e tiveram sua atividade testada inicialmente nas próprias células produtoras HEK293, uma vez que já é esperada expressão do transgene nestas células.

Um ensaio de transfecção de luciferase foi realizado e a atividade de luciferase nestas células produtoras foi confirmada, sendo 70mil vezes maior em células transduzidas com AdCMVLuc em comparação com células não transfectadas. No caso do vírus AdPGLuc este aumento foi de mais de 20mil vezes (figura 8).

Figura 8. Ensaio de luciferase em células HEK293 produtoras dos vírus referidos no gráfico.
RLU- unidade relativa de luminescência.

Passamos então para a produção e purificação do AdCMVLuc e AdPGLuc. Duas produções de cada foram realizadas, purificadas e tituladas. Tendo os vírus já titulados passamos para ensaios de transdução em células PC3. As células foram transduzidas e tiveram sua atividade de luciferase analisada (figura 9).

O ensaio confirmou a atividade de luciferase nas células PC3 48 horas após a transdução. As células transduzidas com o vírus AdCMVLuc tiveram um aumento de quase 100 mil vezes na atividade de luciferase se comparada com as células não

transduzidas. E as células transduzidas pelo vírus AdPGLuc, tiveram um aumento de 28 mil vezes se comparadas ao controle sem transdução.

A expressão de luciferase do vetor AdPGLuc numa células que não possui p53, que é o caso das células PC3, demonstra um pequeno vazamento do promotor PG, que se mostra consistente com outros experimentos utilizando este promotor em nosso laboratório.

Figura 9. Atividade de luciferase em células PC3 transduzidas com os vírus referidos no gráfico 48 horas após a transdução. M.O.I. de 100

4.3 Ensaio repórter com p53 sensível a temperatura

De posse dos vírus AdPGLuc, fizemos ensaios para verificar a resposta do promotor PG à proteína p53. Para tanto utilizamos duas linhagens celulares que possuem proteínas de p53 sensíveis a temperatura. Estas linhagens são a DU-145 e PC3pLPCp53(223) (Bajgelman e Strauss, 2006). A proteína p53 mutante destas células responde à diferença de temperatura, sendo que a 37°C a p53 destas células não é transcricionalmente ativa, mas a 32°C ela reassume seu potencial de transcrição. Assim, essas duas linhagens foram transduzidas com AdPGLuc e cultivadas em diferentes temperaturas, a 32 e a 37°C. Foi então realizado um ensaio

de atividade de luciferase para analisar a resposta do repórter na presença ou ausência de atividade transcricional de p53 (figura 10).

Como esperado, a atividade de luciferase foi superior em células transduzidas com AdPGLuc e cultivadas a 32^oC, superando em quase 22 vezes as células cultivadas a 37^oC na linhagem DU145, e 2,5 vezes na linhagem PC3pLPCp53(223).

Figura 10. Atividade de luciferase em células transduzidas com o vírus AdPGLuc em células da linhagem DU145 e PC3pLPCp53(223). Após células serem transduzidas foram cultivadas a 32 ou a 37^oC por 24 horas, como indicado. Estes dados representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes. RLU – Unidade relativa de luminescência.

4.4 Cinética da expressão do vírus AdPGp53

Para a caracterização do vetor AdPGp53, seria importante saber em que momento ele começa sua expressão, quando a proteína começa a ser traduzida e quando ela inicia sua atividade biológica. Com o intuito de averiguar o pico de atividade do transgene p53, realizamos ensaios de co-transdução utilizando os vírus AdPGp53 e o repórter AdPGLuc, em células da linhagem PC3. Selecionamos diferentes tempos após a transdução para realizar a coleta das células e analisar a atividade de luciferase (figura 11).

A pequena atividade basal do promotor PG permite que haja certo nível de expressão dos transgenes mesmo na linhagem PC3, que é p53 negativa. Mas somente esperamos grande expressão de luciferase nas células co-transduzidas com o vírus AdPGp53, uma vez que a expressão de seu transgene aumentaria ainda mais a atividade do elemento PG do vírus AdPGLuc e também de seu próprio promotor.

Como um controle positivo do ensaio, células PC3 foram co-transduzidas com o vírus repórter AdPGLuc e o vírus com promotor constitutivo AdCMVp53, que possuímos no laboratório.

Figura 11. Ensaio de cinética de expressão de luciferase. Barras representam a expressão de luciferase em diferentes tempos após transdução dos vírus indicados. O sinal (+) na

legenda representa a co-transdução dos dois vetores indicados. RLU – unidade relativa de luminescência.

Como pudemos observar, todas as células transduzidas apresentaram aumento na expressão de luciferase. O vírus AdCMVp53 é o que gera resposta mais rapidamente, seguido pelo AdPGp53. E mesmo sem possuir p53, as células somente transduzidas com o vírus repórter também aumentam sua expressão de luciferase com o tempo.

Importante notar que o pico de expressão de luciferase nas células com AdPGp53 é bem próximo do pico de expressão das células com o promotor constitutivo comandando a expressão de p53. Este experimento mostra uma dinâmica de expressão semelhante entre os vetores AdCMVp53 e AdPGp53. Ambos atingem um pico de valor semelhante, que decresce nas próximas 24hs. Há diferença no tempo em que os vetores atingem o pico de expressão, sendo que o AdCMVp53 atinge sua maior atividade em 48 horas, 24 horas antes do AdPGp53. Este atraso deste último vetor com relação ao AdCMVp53 não é tão surpreendente, já que o promotor PG por ser responsivo a p53 depende desta proteína para sua ativação, enquanto o promotor CMV, por ser constitutivo, é ativado mais rapidamente. Mesmo havendo uma atividade basal do promotor PG, que permite um certo nível de expressão inicial na ausência de p53 na célula PC3, este ainda não é capaz de ativar o elemento PG de maneira plena, o que ocorreria apenas quando o p53 expresso pelo vazamento ativasse PG. Talvez este passo a mais na ativação do promotor PG explique o seu atraso.

Foi também observado que a utilização do vetor AdCMVp53 foi correlacionada com uma queda na atividade de luciferase após 48 horas, e neste momento não temos dados para explicar este achado, mas pretendemos repetir este experimento e realizar controles que permitam encontrar alterações no ciclo celular, indução de morte e também temos planejada a coleta de proteína e RNA para ensaios moleculares como Western e RT-PCR.

4.5 Ensaios de transdução de AdPGp53 - ciclo celular

Para iniciar a investigação do efeito anti-tumoral deste vetor, foram realizados ensaios de ciclo celular com coloração por iodeto de propídeo, em células que não possuem p53 (PC3) e células que possuem p53 mutante sensível à temperatura (DU145) após transdução. Estes resultados mostram um efeito acentuado do vírus AdPGp53 no ciclo celular de ambas as linhagens celulares (figura 12). Já pelo padrão das curvas podemos notar um dos efeitos esperados da superexpressão de p53, que seria o aumento da morte celular. Este aumento na morte celular é caracterizada pelo aumento de células em fase subG0, que se torna bem evidente na adição do AdPGp53 em comparação com células não transduzidas ou transduzidas com AdEGFP-ICB (figura 13).

Os ensaios de ciclo celular foram realizados inicialmente a um MOI de 50 do vírus AdPGp53. Nas primeiras tentativas, durante a padronização, não observamos alterações do ciclo, e por isso aumentamos o MOI utilizado para 200. Com uma melhor padronização do protocolo, passamos a observar um efeito significativo no ciclo, mesmo a um MOI de 50.

Figura 12. Efeito da transdução do vírus AdPGp53 em células DU145 e PC3. Estas células foram plaqueadas em placas de 35mm, transduzidas com os vírus AdEGFP ou AdPGp53 com um MOI de 50 e incubadas nos tempos indicados. Ao final da incubação as células foram suspensas, coletadas e coradas para ensaio de ciclo celular. Estão indicados nos gráficos as áreas correspondentes às etapas do ciclo celular: M1=sub-G1, M2=G0/G1, M3=S, M4=G2/M.

Parte desta padronização foi aumentar o tempo de coleta das células, baseando-nos nas curvas de expressão dos experimentos de cinética de expressão de luciferase, que mostraram que a ativação por p53 é mais presente a partir de 72 horas.

Figura 13. Porcentagem de células em sub-G0, indicando morte celular. Barras representam porcentagem de eventos adquiridos por citometria de fluxo com fluorescência inferior à de G0-G1. Td - transdução

Assim, a partir de 72 horas temos um aumento significativo de células que passaram por algum processo de morte celular, evidenciado no experimento por aumento de células em sub-G0 em comparação com o vetor controle AdEGFP (figura 13). Confirmamos assim a ação fisiológica desejada de nosso vetor, induzindo morte celular nesta linhagem de célula tumoral

4.6 Comparação entre o vetor com elemento PG e o vetor com promotor constitutivo – Morte Celular

Confirmamos assim a ação fisiológica desejada de nosso vetor, induzindo morte celular nesta linhagem de célula tumoral. Mas como seria sua eficiência em comparação com um vetor de promotor constitutivo como o CMV?

Após esta padronização da transdução do vetor *in vitro*, realizamos um novo experimento de transdução para comparar a ação do vetor AdPGp53 com o vetor contendo o promotor constitutivo AdCMVp53. Para tais experimentos foram usadas dois lotes diferentes do vírus AdPGp53, denominados como AdPGp53-1 e AdPGp53-2 (quadro 1). A primeira produção, por ter atingido título viral não tão alto ($1,3 \times 10^9$ pfu/mL) e ter sido usado nas injeções *in vivo* que consomem grande volume, foi totalmente utilizada e assim passamos a utilizar a nova produção 2 e foi neste ponto que passamos a ver divergência nos resultados destas duas produções. Os experimentos de ciclo celular utilizando a produção 1 se mostraram bem promissoras, atingindo melhor índice de morte que o vetor AdCMVp53 (figura 14)

Figura 14. Análise de FACS mostrando porcentagem de células em sub-G0, indicando morte celular. Barras representam porcentagem de eventos adquiridos por citometria de fluxo com fluorescência inferior à de G0-G1. Células transduzidas com os vetores indicados; M.O.I. de 100. Desvio padrão referente a três experimentos (exceto tempo de 144 horas que foi coletado em apenas um experimento)

O vetor AdPGp53-1 está causando morte celular de maneira muito consistente e mais acentuada que o vetor com promotor constitutivo. Interessante notar que o vetor AdCMVp53 não parece ter alterado a morte celular neste tipo de experimento. Possivelmente o vetor PG de alguma maneira está levando a célula para a morte enquanto que o vetor CMV está interferindo na fisiologia da célula de outras maneiras, talvez até induzindo senescência. Ainda não sabemos o que pode ter gerado respostas tão diferentes.

Novas repetições do experimento foram realizadas, sendo que os vetores AdCMVp53 e AdLacZ utilizados foram sempre do mesmo lote, mas agora usando o lote AdPGp53-2. Esperávamos um resultado idêntico ao anterior ao analisar morte celular, mas o que vimos foi uma queda neste nível de morte nas células transduzidas com AdPGp53-2 (figura 15).

Figura 15. Análise de FACS mostrando morte celular com lote AdPGp53-2. Barras representam porcentagem de eventos adquiridos por citometria de fluxo com fluorescência inferior à de G0-G1. Células transduzidas com os vetores indicados; M.O.I. de 200. Desvio padrão referente a dois experimentos

Para tentar entender melhor o que estava acontecendo, principalmente para saber se o efeito de morte anteriormente visto era um artefato ou simplesmente um problema com este lote de AdPGp53, repetimos novamente o experimento de transdução para ciclo celular agora com um m.o.i. de 1000 para a produção 2, dez vezes mais do que usado anteriormente (figura 16), e com uma outra produção

(AdPGp53-3) com um m.o.i. de 200, a mesma da utilizada nos experimentos anteriores. Este aumento no m.o.i. mostrou uma elevação no nível de morte do AdPGp53-2, reproduzindo o resultado que havíamos obtido com o lote anterior.

Figura 16. Análise de FACS mostrando morte celular com lote AdPGp53-produção 2. Barras representam porcentagem de eventos adquiridos por citometria de fluxo com fluorescência inferior à de G0-G1. Células transduzidas com os vetores indicados; M.O.I. de 1000 exceto AdPGp53-prod3: m.o.i. de 200.

Isso mostra que o vetor AdPGp53 é realmente capaz de causar morte celular, e que os problemas de inconsistência nos resultados dizem respeito, provavelmente, a problemas técnicos de padronização do experimento. Este problema pode ser devido a uma superestimação do título do vetor AdPGp53-2, já que das três produções utilizadas, o único lote que não induziu morte com um m.o.i. de 200 foi este, que ao ter o m.o.i. aumentado passou a causar morte.

Um fato que chama atenção foi a elevação dos níveis de morte celular do vetor AdCMVp53 com este m.o.i. de 1000. Ele que não havia gerado morte celular maior que o controle negativo em todos os experimentos a um m.o.i. de 200 passou a gerar grande morte celular a partir do aumento da concentração de vírus.

Talvez toda esta diferença se deva não diretamente a características dos promotores, mas aos vetores terem diferentes eficiências de transdução viral, o que faria com que mais ou menos células realmente recebessem o cassete de expressão. Para responder a esta pergunta foram realizados ensaios de imunocitoquímica para verificar a presença do transgene e a eficiência da transdução da célula PC3 pelos vetores.

4.7 Detecção de p53 por imunocitoquímica

O ensaio de imunocitoquímica foi realizado com o objetivo de detectar o transgene dos vetores com p53 e determinar como estas células estão sendo transduzidas, se a transdução está sendo eficiente e expressando o transgene e o quanto os diferentes vetores estão realmente sendo efetivos na transferência gênica.

O tempo de coleta escolhido foi de 48 horas após a transdução viral. Esta escolha está embasada na resposta a p53 atingida pelos ensaios de luciferase e os de ciclo celular, que apresentaram respostas a ação de p53 já em 48-72 horas, sendo assim, imaginamos que a presença de p53 já se dê momentos antes, como 24-48 horas após a transdução. Coletas a partir de 72 horas, quando já se observa número significativo de mortes com o vetor AdPGp53-1, poderiam dificultar a interpretação para comparação deste vetor com AdCMVp53.

Este ensaio deixou clara a presença de p53 apenas nas células transduzidas com os vetores contendo este transgene, não apresentando reações inespecíficas. Neste experimento, as células transduzidas com o vetor AdCMVp53 mostraram marcação em 21% das células, enquanto que as transduzidas com o vetor AdPGp53-1 mostraram 30% de células marcadas positivamente (figura 17).

Apesar do vetor com elemento PG ter apresentado maior número de células com p53 marcado, este aumento ainda não justifica a grande diferença entre os vetores apresentada nos experimentos de morte celular com este vetor AdPGp53-1, onde a diferença na porcentagem de células mortas foi de 4 vezes em 72 horas e de quase 7 vezes em 120 horas após transdução (figura 14)

Imunohistoquímica para p53

Figura 17. Imunocitoquímica para marcação de p53. Células da linhagem PC3 transduzidas com os vetores indicados (AdPGp53-1) e fixadas após 48hs da transdução. Aumento de 20x

4.8 RT-PCR de PC3 transduzidas com vírus

Para que pudéssemos quantificar a expressão de p53 e outras proteínas pertencentes a sua via, células pc3 foram transduzidas com os vírus e tiveram seu RNA extraído a cada 48, 72, 96 e 120 horas após a transdução. Um ensaio de RT-PCR foi realizado e analisado.

Figura 18. RT-PCR de células PC3 transduzidas com vírus. Células transduzidas com M.O.I de 200 dos vetores indicados e que tiveram o RNA extraído nos tempos indicados acima. O AdPGp53 deste ensaio é o AdPGp53-2.

Neste experimento foi utilizado o lote AdPGp53-2, o mesmo que não mostrou alteração de morte celular (figura 15). Mesmo sem mostrar diferença de morte com relação ao AdCMVp53, percebemos algumas alterações importantes no nível transcricional entre estes dois vetores (figura 18). P53 passa a ser transcrito com perfis diferentes entre as células PC3 que receberam o vírus AdCMVp53 e AdPGp53-2, onde o primeiro vetor apresenta uma expressão constante desde 48 até 120 horas. Já o vetor AdPGp53, apesar de iniciar seu nível de transcrição mais baixo que o do AdCMVp53, passa a aumentar até ultrapassá-lo a partir de 96 horas.

Podemos ver esta mesma dinâmica de elevação em células com o vetor AdPGp53 para os níveis de hdm2, p21 e PUMA, que são diretamente ativados transcricionalmente por p53.

O vetor AdCMVp53 também mostra esta dinâmica de elevação dos transcritos de hdm2 e p21 que parece ser uma elevação mais sutil, mas que de maneira absoluta é bem mais forte que o nível de expressão apresentado por AdPGp53 mesmo em seu tempo de expressão mais alta.

4.9 Ensaio in vivo: AdPGp53 e sua influência no crescimento tumoral

De posse do vetor AdPGp53-1, passamos a padronizar as injeções de células para formação de tumor. Foram utilizados camundongos atímicos da linhagem Balb/c num modelo xenográfico, onde foram injetadas células da linhagem PC3. Num primeiro piloto foram injetados subcutaneamente 20 animais com 2×10^6 células cada. Foi observado o tempo de crescimento dos tumores, que levaram em média 4 semanas para se tornarem palpáveis. As injeções dos vírus foram aplicadas quando os tumores atingiram volume de 60 mm^3 . Foram injetadas 3×10^8 partículas virais por tumor por aplicação, totalizando 3 aplicações, uma a cada três dias.

Três animais foram injetados com AdPGp53 e outros três foram injetados com um vetor controle AdLacZ. Três dias após a terceira injeção de vírus os animais foram sacrificados e tiveram os tumores coletados.

Figura 19. Gráfico do crescimento tumoral nos animais injetados com vírus. Foram medidos com paquímetro os diâmetros maiores e menores e aplicados à fórmula: $(\text{diâmetro maior}) \times (\text{diâmetro menor})^2 / 2$.

Apesar do número de animais ainda ser baixo e o tempo de observação muito limitado, pudemos perceber que todos os animais injetados com o vírus AdPGp53 tiveram o volume tumoral reduzido. Já os animais injetados com AdLacZ apresentaram crescimento, exceto um deles que também sofreu uma redução de tamanho (figura 19).

4.10 Ensaio in vivo: Análise histológica dos tumores

Após o sacrifício dos animais injetados com AdPGp53 e AdLacZ, os tumores foram coletados, fixados e emblocados em parafina para serem então cortados e analisados histologicamente.

A primeira marcação feita foi a coloração com hematoxilina-eosina a fim de permitir caracterizar os tumores estruturalmente, e eventualmente até mesmo detectar áreas de necrose e apoptose.

Estruturalmente os tumores apresentaram diferenças entre os dois grupos tratados com os vírus. Os tumores que receberam AdLacZ apresentam maior tamanho e uma maior organização, com áreas viáveis e proliferativas na periferia e uma grande área necrótica no interior (figura 20). Já os tumores tratados com AdPGp53 não apresentam esta organização; áreas necróticas aparecem mais espalhadas, em meio a áreas viáveis. Também nos tumores tratados com AdPGp53 pode-se observar mais áreas que apresentam núcleos fragmentados, sendo um indicativo de morte celular (figura 21). Mas novamente temos o problema de serem poucos animais para que possamos que a diferença estrutural é realmente significativa.

Figura 20. Lâminas de tumores tratados com os vírus AdLacZ ou AdPGp53. Setas indicam áreas de necrose. Coloração hematoxilina-eosina. Fotos num aumento de 4x.

Figura 21. Lâminas de tumores tratados com os vírus AdLacZ ou AdPGp53. Setas indicam áreas com núcleos fragmentados, indicando células em processo de apoptose. Coloração hematoxilina-eosina. Fotos num aumento de 20x.

Para confirmar a presença de processos apoptóticos nos tumores, realizamos um experimento de TUNEL utilizando o kit comercial Cell Death essay da empresa Roche (figura 22).

Várias áreas foram marcadas nas amostras do grupo tratado com AdLacZ principalmente na região correspondente a área de necrose evidenciada no ensaio com hematoxilina-eosina. Já as amostras tratadas com AdPGp53 mostraram regiões menores e mais isoladas de marcação para apoptose.

Figura 22. Ensaio de morte celular (TUNEL). Lâminas de tumores tratados com os vetores indicados. Foi utilizando o kit comercial Cell Death Essay da empresa Roche.

Este resultado acabou não mostrando uma diferença muito significativa, pelo menos quantitativa, de áreas marcadas entre os dois grupos de tumores injetados, tornando difícil uma comparação ou definição de um padrão. Exige-se aqui um maior número de animais tanto para melhor padronizar o experimento de TUNNEL como para poder realmente encontrar diferenças significativas, caso elas realmente existam.

5 DISCUSSÃO

Ao longo deste trabalho, vários vetores foram construídos e tiveram sua atividade de expressão do transgene avaliada.

Os vetores repórteres AdPGLuc e AdCMVLuc são vetores que foram importantes para este trabalho e ainda serão de grande utilidade para outros projetos em nosso laboratório.

O vetor AdPGp53, primeiro dos vetores de interesse a ser construído, pôde ser explorado, tanto para sua caracterização como na sua atuação fisiológica. Com relação a este vetor pudemos acompanhar sua cinética de expressão, mostrando que o pico de atividade do transgene deste vetor ocorre 72 horas após a transdução do vírus em células PC3 (figura 11), o que possibilitou padronizar nossos experimentos com relação ao tempo de ação do vetor.

Passamos então para a comparação entre o vetor com promotor PG e o constitutivo CMV, afinal o promotor CMV mostrou uma ação do transgene mais rápida que o PG nos experimentos de cinética com luciferase, sendo seu pico de atividade 24 horas anterior ao AdPGp53. Além disso, o pico de atividade deste mesmo ensaio é aproximadamente o mesmo, apesar de sabermos que ensaios de luciferase não podem ser considerados quantitativamente nos seus termos absolutos. Mas apesar desta equivalência e superioridade, no que diz respeito ao menor tempo de resposta, o vetor AdCMVp53 se mostrou muito menos efetivo em matar células da linhagem PC3 que o vetor AdPGp53 (figura 14). Enquanto o vetor AdCMVp53 quase não apresenta alteração no nível de morte celular quando comparado ao controle, o vetor AdPGp53 matou mais de 70% destas células.

Entretanto, a repetição deste experimento de ciclo celular, utilizando outro lote do vetor AdPGp53, não reproduziu os resultados atingidos com o primeiro lote. Os resultados não mostraram aumento de morte celular, fato este que poderia ter duas explicações imediatas: ou o resultado com o primeiro lote não passou de um artefato, ou houve algum problema na produção deste segundo lote que o fez cair de rendimento. O primeiro foco de abordagem para solucionar este problema foi aumentar a concentração viral utilizada no experimento, para verificar se o problema do lote AdPGp53-2 era seu título, que poderia estar superestimado. Começamos por aí pois a titulação é uma parte sensível da produção viral e seus resultados podem variar muito, sendo difícil de padronizar. Mesmo tendo optado por um kit comercial

Adeno-X Rapid Titer Kit da empresa Clontech, verificamos variações quando comparado com outros métodos de titulação utilizados anteriormente no laboratório, sendo eles a titulação biológica, que consiste em visualizar o efeito citopático do vírus em diluições seriadas, e a titulação física por quantificação do DNA viral em espectrofotômetro.

Ao aumentar o m.o.i. do experimento de 200 para 1000 partículas virais por célula, voltamos a ver a ação do vírus gerando morte celular de maneira semelhante a observada no primeiro experimento. Isto mostra que apesar dos diferentes lotes mostrarem variações, o vetor AdPGp53 é capaz de causar morte celular na linhagem PC3.

Assim, a diferença nos resultados das repetições do ensaio de ciclo celular não impediram de provar a ação do vetor AdPGp53, mas dificultaram a sua comparação com o vetor AdCMVp53. Nos experimentos com m.o.i. de 200 o vetor AdCMVp53 mal se diferenciou dos controles negativos. Já quando o m.o.i. foi elevado a 1000 causou morte em nível significativo (figura 16), na verdade tão eficiente quanto o vetor AdPGp53. Seu efeito parece começar mais cedo, em 48hs, mas os níveis dos dois vetores se igualam em seguida. Como interpretar este dado sabendo que cada lote de AdPGp53 reagiu de uma maneira diferente? Com qual dos lotes podemos comparar o AdCMVp53?

Creemos que o AdPGp53-2 deve ter algum problema na fase de titulação e talvez tenha o seu título superestimado, fazendo com que a um m.o.i. de 200 não haja vírus suficiente para gerar a resposta apresentada por dois outros lotes que responderam causando morte de maneira igual (AdPGp53-1 e AdPGp53-3).

Esta diferença de ação entre AdCMVp53 e AdPGp53 levantou a questão da eficiência de transdução dos vetores, onde o vetor AdPGp53 poderia ter maior eficiência na transdução e isto explicaria esta discrepância. Com vista nesta pergunta, o experimento de detecção imunocitológica de p53 teve importância maior que apenas mostrar a presença de p53 dentro das células, mas acabou também revelando que o nível de transdução dos vetores não era a explicação para a diferença entre eles. Afinal, apesar do vetor AdPGp53 ter apresentado maior número de células positivas para p53, 30% contra 21% do AdCMVp53, esta diferença não

parece ser em proporção suficiente para explicar o resultado tão díspar da morte celular.

Novas perguntas surgiram, como por exemplo, qual seria o mecanismo que estaria sendo ativado nestas células? Neste contexto que realizamos o ensaio de RT-PCR, com o intuito de quantificar a expressão de p53 e outras proteínas de suas vias clássicas. Este ensaio foi realizado com o lote AdPGp53-2, justamente o que não apresentou morte celular a um m.o.i. de 200, mas mesmo sem gerar esta resposta pudemos perceber diferenças nos níveis de expressão bem significativas entre CMV e PG. Como esperado, o nível de expressão do AdCMVp53 é constante, enquanto que o AdPGp53 parte de um nível baixo até um nível mais alto de expressão, chegando a ultrapassar o nível do vetor CMV. Sendo a intenção do projeto construir um vetor forte para expressão de p53, ultrapassar o promotor CMV é um resultado muito interessante.

No caso dos outros transcritos, seria arriscado afirmar neste momento que encontramos um padrão que explique as diferenças encontradas entre os vetores. Podemos dizer que realmente são diferentes, mas para definir o mecanismo destas diferenças mais ensaios precisam ser realizados, principalmente um ensaio em que, seguros de estarmos utilizando a mesma quantidade de todos os vetores testados, haja morte celular e possamos definir com mais confiança o padrão transcricional que realmente leva a esta morte.

Claro que alguns fatos não deixam de ser interessantes, como a maior transcrição de p53 pelo vetor AdPGp53 mas que não é acompanhada pelo aumento proporcional de p21 que é um indicador clássico e direto de ativação de p53 (Boulay et al., 2000), mas aparece mais no vetor AdCMVp53 apesar do nível de p53 neste ser menor. Por isso ainda exigem-se mais ensaios.

Se tomarmos por verdade que o vetor AdPGp53-2 teve seu título superestimado e mesmo assim atinge níveis transcricionais mais altos que o AdCMVp53, e se somarmos a isso o fato de os outros lotes de AdPGp53-1 e -3 estão com o título correto e causam mais morte que o vetor constitutivo, podemos supor que a morte das células PC3 dependem da quantidade de p53 ultrapassar certo nível, que para o AdPGp53 seria atingido já com um m.o.i. de 200 e para o AdCMVp53 só seria atingido a um m.o.i. de 1000, como mostrado na figura 16.

Sempre lembrando que mais ensaios devem ser realizados para confirmar esta afirmação.

De posse destes dados interessantes *in vitro*, passamos a testar o vetor AdPGp53 em tumores induzidos em animais num modelo xenográfico, usando as mesmas células da linhagem PC3.

Estes efeitos de morte podem estar se refletindo nos ensaios *in vivo*, onde os tumores tratados com o vírus AdPGp53-1 apresentaram uma redução de tamanho após o tratamento, ao contrário dos tratados com o vírus controle que seguiram crescendo. Claro que o número de animais utilizado e o tempo de observação ainda são pequenos para podermos constatar algo mais concreto, mas também a observação histológica por coloração de hematoxilina-eosina parece mostrar um padrão estrutural nos tumores injetados com vírus controle AdLacZ, que parecem bem diferentes dos tratados com AdPGp53, os quais pareciam conter mais áreas apoptóticas, caracterizadas por núcleos fragmentados. Mas a coloração por hematoxilina-eosina é apenas um primeiro passo, sendo que ensaios de morte celular por TUNEL são mais informativos neste sentido. Mas estes ensaios não trouxeram um padrão que determinasse alguma diferença significativa entre os dois grupos tratados, principalmente por não podermos detectar maior quantidade de morte em um grupo que em outro. As áreas de necrose de ambos os grupos apareceram muito marcadas, e pontos em que realmente parecia haver apoptose estavam presentes em ambos os grupos.

A continuidade deste trabalho depende principalmente de mais resultados de experimentos *in vivo*, tanto para confirmar os dados de retardo de crescimento tumoral, com o tratamento usando AdPGp53, como para expandir este estudo com um outro grupo de animais a serem tratados com o vetor AdCMVp53 e assim podermos comparar a ação destes dois vetores que já se mostraram bem diferentes nos ensaios *in vitro*.

6 CONCLUSÕES

- O vetor AdPGp53 é capaz de causar morte celular em células da linhagem PC3
- Os vetores AdPGp53 e AdCMVp53 apresentam diferenças significativas, tanto na cinética da expressão e ação de p53, se manifestando primeiro pelo AdCMVp53, quanto por distinções no nível transcricional de proteínas ligadas à via de p53.
- Ensaios *in vivo* com injeção do vetor AdPGp53 diretamente em tumores sugerem uma diminuição na taxa de crescimento e até redução no volume tumoral.

REFERÊNCIAS

Referências¹

Bajgelman MC, Strauss BE. The DU145 human prostate carcinoma cell line harbors a temperature-sensitive allele of p53. *Prostate*. 2006;66(13):1455-62.

Bajgelman MC, Strauss BE. Development of an adenoviral vector with robust expression driven by p53. *Virology*. 2008;371(1):8-13.

Beckerman RaP, C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010.

Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*. 1985;41(2):521-30.

Boulay JL, Perruchoud AP, Reuter J, Bolliger C, Herrmann R, Rochlitz C. P21 gene expression as an indicator for the activity of adenovirus-p53 gene therapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Gene Ther*. 2000;7(9):1215-9.

Brooks AR, Harkins RN, Wang P, Qian HS, Liu P, Rubanyi GM. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med*. 2004;6(4):395-404.

Chen P, Tian J, Kovesdi I, Bruder JT. Promoters influence the kinetics of transgene expression following adenovector gene delivery. *J Gene Med*. 2008;10(2):123-31.

Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(10):4455-9.

Cheng T, Xu CY, Wang YB, Chen M, Wu T, Zhang J, et al. A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. *World J Gastroenterol*. 2004;10(11):1612-8.

Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*. 1992;255(5043):459-62.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003- Available from <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell*. 2003;4(5):371-81.

Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, et al. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet*. 1993;4(1):42-6.

Dornan D, Hupp TR. Inhibition of p53-dependent transcription by BOX-I phosphopeptide mimetics that bind to p300. *EMBO Rep*. 2001;2(2):139-44.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993;75(4):817-25.

Fitzsimons HL, Bland RJ, During MJ. Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain. *Methods*. 2002;28(2):227-36.

Furth PA, Hennighausen L, Baker C, Beatty B, Woychick R. The variability in activity of the universally expressed human cytomegalovirus immediate early gene 1 enhancer/promoter in transgenic mice. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(22):6205-8.

Garmory HS, Titball RW, Brown KA, Bennett AM. Construction and evaluation of a eukaryotic expression plasmid for stable delivery using attenuated *Salmonella*. *Microb Pathog*. 2003;34(3):115-9.

Ghazal P, DeMattei C, Giulietti E, Kliwer SA, Umesono K, Evans RM. Retinoic acid receptors initiate induction of the cytomegalovirus enhancer in embryonal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(16):7630-4.

Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 2009;458(7242):1127-30.

Guo Z, Kumagai A, Wang SX, Dunphy WG. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*. 2000;14(21):2745-56.

Harms JS, Splitter GA. Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum Gene Ther*. 1995;6(10):1291-7.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-9.

Hermeking H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell*. 2007;12(5):414-8.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253(5015):49-53.

Hsiao M, Low J, Dorn E, Ku D, Pattengale P, Yeargin J, et al. Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *American Journal of Pathology*. 1994;145(3):702-14.

Isern E, Gustems M, Messerle M, Borst E, Ghazal P, Angulo A. The Activator Protein 1 Binding Motifs within the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Enhancer Are Functionally Redundant and Act in a Cooperative Manner with the NF- κ B Sites during Acute Infection. *J Virol*. 2010;85(4):1732-46.

Joerger AC, Fersht AR. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*. 2007;26(15):2226-42.

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. 1991;252(5013):1708-11.

Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science*. 1992;256(5058):827-30.

Kim KI, Kang JH, Chung JK, Lee YJ, Jeong JM, Lee DS, et al. Doxorubicin enhances the expression of transgene under control of the CMV promoter in anaplastic thyroid carcinoma cells. *J Nucl Med*. 2007;48(9):1553-61.

Langerod A, Zhao H, Borgan O, Nesland JM, Bukholm IR, Ikdahl T, et al. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2007;9(3):R30.

Lavin MF, Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*. 2006;13(6):941-50.

Lowe SW, Ruley HE. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* 1993;7(4):535-45.

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 1993a;74(6):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(6423):847-9.

Meek DW. Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene.* 1999;18(53):7666-75.

Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.* 1994;54(12):3131-5.

Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293-9.

Murphy JC, Fischle W, Verdin E, Sinclair JH. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.* 2002;21(5):1112-20.

Nelson JA, Reynolds-Kohler C, Smith BA. Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol Cell Biol.* 1987;7(11):4125-9.

Oliner JD, Pieterpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature.* 1993;362(6423):857-60.

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(1):

Qin JY, Zhang L, Clift KL, Hult I, Xiang AP, Ren BZ, et al. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One.* 2010; 5(5).

Raycroft L, Wu HY, Lozano G. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science.* 1990;249(4972):1049-51.

Rideg K, Hirka G, Prakash K, Bushar LM, Nothias JY, Weinmann R, et al. DNA-binding proteins that interact with the 19-base pair (CRE-like) element from the HCMV major immediate early promoter in differentiating human embryonal carcinoma cells. *Differentiation*. 1994;56(1-2):119-29.

Ritter T, Brandt C, Prosch S, Vergopoulos A, Vogt K, Kolls J, et al. Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promoter activity in human endothelial cells. *Cytokine*. 2000;12(8):1163-70.

Rolley N, Butcher S, Milner J. Specific DNA binding by different classes of human p53 mutants. *Oncogene*. 1995;11(4):763-70.

Sambucetti LC, Cherrington JM, Wilkinson GW, Mocarski ES. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J*. 1989;8(13):4251-8.

Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, van Laar T, Dekker P, Bazuine M, et al. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J*. 1996;15(19):5349-57.

Strauss B, Bajgelman MC, Costanzi-Strauss E. A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition. *Cancer Gene Therapy*. 2005; 12, 935–946.

Strauss BE, Costanzi-Strauss E. pCLPG: a p53-driven retroviral system. *Virology*. 2004;321(2):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(1):333-40.

Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev*. 1999;13(2):152-7.

Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24(3):148-54.

Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, et al. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. *Hum Mutat*. 2003;21(3):307-12.

Wade EJ, Klucher KM, Spector DH. An AP-1 binding site is the predominant cis-acting regulatory element in the 1.2-kilobase early RNA promoter of human cytomegalovirus. *J Virol*. 1992;66(4):2407-17.

Wang Y, Helland A, Holm R, Skomedal H, Abeler VM, Danielsen HE, et al. TP53 mutations in early-stage ovarian carcinoma, relation to long-term survival. *Br J Cancer*. 2004;90(3):678-85.

Xavier-Neto J, Pereira AC, Motoyama AH, Krieger JE. A luciferase-engineered cell line for study of cAMP regulation in endothelial cells. *Am J Physiol*. 1998;275(1 Pt 1):C75-81.

Xu ZL, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Uchida E, Mayumi T, Hayakawa T. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*. 2001;272(1-2):149-56.

Zhang XY, Inamdar NM, Supakar PC, Wu K, Ehrlich KC, Ehrlich M. Three MDBP sites in the immediate-early enhancer-promoter region of human cytomegalovirus. *Virology*. 1991;182(2):865-9.

Zheng C, Baum BJ. Evaluation of viral and mammalian promoters for use in gene delivery to salivary glands. *Mol Ther*. 2005;12(3):528-36.

ANEXO - ARTIGO PUBLICADO

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