ANNA CAROLINA PEREIRA VIEIRA DE CARVALHO

Construção e caracterização de um vírus Adeno-associado com expressão direcionada para células em divisão

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

São Paulo

2010

Anna Carolina Pereira Vieira de Carvalho

**Construção e caracterização de um vírus Adeno-associado com expressão direcionada
para células em divisão**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Bryan Eric Strauss

São Paulo

2010

Dedico este trabalho aos meus
pais, pelo carinho, incentivo e por
sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, ao meu orientador Dr. Bryan Eric Strauss, por me aceitar no laboratório, acho que ele não sabia exatamente onde estava se metendo, mas só posso dizer que eu não poderia concluir meu Mestrado sob a orientação de outra pessoa. Agradeço todos os ensinamentos e paciência.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao meu grupo, foi muito legal desenvolver esse trabalho na companhia de vocês, agradeço os bons momentos e paciência e também a todos do laboratório por tornarem o ambiente de trabalho fácil, engraçado e descontraído.

Agradeço a Ana Lúcia Garippo pela ajuda no microscópio confocal e pelas conversas construtivas.

Márcio, Daniela Jardim e Mariliza pela ajuda com o Real Time, sem vocês a finalização desse trabalho não seria possível.

Aos meus amigos, pelo convívio, amizade e risadas.

A minha família por ser tão bonita, engraçada e positiva.

Enfim, a todos que contribuíram com este trabalho de diversas maneiras e que se eu fosse citar ficaria complicado, mas sou uma pessoa de sorte.

Obrigada!

RESUMO

Carvalho A. C. Construção e caracterização de um vírus Adeno-associado com expressão direcionada para células em divisão (Dissertação). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;2010.

A utilização do vírus Adeno-associado recombinante (AAVr) como vetor de transferência gênica em células tumorais está crescendo. Neste trabalho, o promotor gênico de E2F-1, um promotor ativo durante a divisão celular, foi inserido no AAVr e utilizado para dirigir a expressão do HSV-tk ou luciferase e, simultaneamente, eGFP com o objetivo de direcionar a expressão viral para células em proliferação. Em paralelo, foram construídos vetores portadores do promotor constitutivo CMV para servir como controles. O promotor gênico de E2F-1 não foi eficiente em dirigir a expressão dos transgenes na linhagem celular HT1080. Em comparação, a utilização do promotor CMV permitiu a observação da atividade de luciferase, eGFP e HSV-tk. O motivo da baixa eficiência do promotor E2F-1 no vetor AAVr ainda não foi explorado, mas poderia estar relacionado com o desempenho intrínseco deste promotor, a biologia do vetor AAVr e especificidade celular. Porém, o bom desempenho do vetor AAVr contendo o promotor CMV abre a possibilidade de realizar novos ensaios de transferência gênica para tratamento e visualização de células tumorais.

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

ABSTRACT

Carvalho, A. C. Construction and characterization of adeno-associated virus with limited expression for proliferating cells.2010. Master thesis (Biotechnology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,São Paulo,2010.

The utilization of recombinant adeno-associated virus (AAVr) as a gene transfer vector in tumor cells is increasing. In this work, the promoter of the E2F-1 gene, active during cell division, was inserted in an AAVr vector and used to drive the expression of HSV-tk or luciferase and, simultaneously, eGFP with the intent of limiting viral expression to proliferating cells. Also, vectors with the constitutive CMV promoter were constructed to be used as controls. The E2F-1 promoter was not efficient in driving the expression of the transgenes in the HT1080 cell line, while the CMV promoter shows high level expression of the reporter and the therapeutic genes. The low efficiency of E2F promoter has not yet been explored, though this problem could be related to the intrinsic performance of this promoter, the biology of the vector AAV and cell-specific factors. However, the performance of the AAVr containing the CMV promoter creates the possibility of performing new gene transfer protocols for the treatment and visualization of tumor cells.

Key words: Gene expression. Vectors. Neoplasm. Gene transfer. Biologic therapy. Cell division.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do ciclo celular de uma célula normal.....	18
Figura 2 - Representação da família E2F.....	21
Figura 3 - Vírus mais utilizados em protocolos clínicos de terapia gênica.....	23
Figura 4 - Estrutura viral e genômica do vírus selvagem.....	27
Figura 5 - Vetores e produção de AAVr.....	29
Figura 6 - Conversão de ganciclovir em ganciclovir trifosfato.....	34
Figura 7 - Representação esquemática dos vetores.....	46
Figura 8 - Mapa de restrição dos vetores.....	47
Figura 9 - Atividade de Luciferase após transfecção de células HT1080 com os plasmídeos indicados.....	49
Figura 10 - Análise da expressão de eGFP obtida pela transfecção de células HT1080 com os plasmídeos indicados.....	50
Figura 11 - Análise de eGFP por microscopia de fluorescência após a transfecção de HT1080.....	51
Figura 12 - Análise de Luciferase após a transdução de células HT1080.....	52
Figura 13 - Análise da expressão de eGFP após transdução de células HT1080.....	53
Figura 14 - Análise de Luciferase após transdução de células HT1080 com quantidades crescentes de preparação viral.....	54
Figura 15 - Detecção de TK por imunofluorescência após transdução.....	55
Figura 16 - Observação do efeito <i>bystander</i> após a contagem de células HT1080 viáveis.....	56
Figura 17 - Observação do efeito <i>bystander</i>.....	57
Figura 18 - Representação esquemática dos vetores.....	59
Figura 19 - Mapa de restrição dos vetores AAVE2Fβ.....	59
Figura 20 - Análise de luciferase após transfecção de células HT1080.....	60
Figura 21 - Análise da expressão de eGFP por citometria de fluxo após transfecção de HT1080.....	61
Figura 22 - Análise de luciferase após transfecção de células 293T.....	62
Figura 23 - Análise da expressão de eGFP por citometria de fluxo após transfecção de 293T.....	63

Figura 24 - Análise de Luciferase após transdução de células HT1080 com quantidades iguais dos seis vírus.....	64
Figura 25 - Análise da expressão de eGFP por citometria de fluxo de células HT1080 transduzidas com quantidades iguais dos seis vírus.....	65
Figura 26 - Detecção de TK por imunofluorescência após a transdução.....	66
Figura 27.- Ensaio dos 6 vírus para verificar a atividade de TK.....	67
Figura 28 - Observação do efeito <i>bystander</i>	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desenvolvimento de defeitos em camundongos <i>knockout</i> para E2F.....	20
Tabela 2 - Tipos de genes suicidas.....	34
Tabela 3 - Primers utilizados para amplificação do promotor gênico de E2F-1.....	40
Tabela 4 - Primers utilizados para Titulação.....	42
Tabela 5 – Tamanho esperado das bandas liberadas após o corte dos vetores com as enzimas de restrição.....	47
Tabela 6 – Tamanho esperado para as bandas liberadas após corte dos vetores com as enzimas de restrição.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV – vírus adeno-associado
AAVr - vírus adeno-associado recombinantes
ACL - Amaurose Congênita de Leber
ACV- aciclovir
Ad – Adenovírus
ara-M- arabinose 6-metóxi purina
BVDU- (E)-5-(2-bromovinil)-2´deoxiuridina
C – citosina
Cap – capsideo
CDK – “Cyclin Dependent Kinases”
CFTR - regulador transmembrana de fibrose cística
CIAP - fosfatase alcalina
CMV- citomegalovírus
CPA- ciclofosfamida
CsCl – Cloreto de Césio
Ctrl – controle
DNA - ácido desoxirribonucleico
eGFP- “Enhanced Green Fluorescent Protein”
EHV- Vírus da Herpes Equina
ER – receptor de estrógeno
FGF - fator de crescimento de fibroblasto
FGFR1- receptor do fator de crescimento de fibroblasto.
5-FC- 5-fluorocitosina
5-FU- 5-fluoracil
G – guanina
GCV-ganciclovir
GDEPT – “Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy”
H₂O - água
HSPG – “Heparan Sulfate Proteoglycans”
HSV – “Herpes Simplex Vírus”
IFO- ifosfamida
IGF - fator de crescimento semelhante a insulina
IMF – Imunofluorescência
Inca - Instituto Nacional do Câncer
IREs- sitio de entrada do ribossomo
ITRs – “Inverted Terminal Repeats”
LacZ - beta galactosidase
Luc – luciferase
MgCl₂ - cloreto do magnésio
MOI - “Multiplicity of Infection”
Nab - anticorpos neutralizantes
OHT- hidroxitamoxifeno
PBS – “Phosphate Buffered Saline”
PCR – “Polymerase Chain Reaction”
PDGF - fator de crescimento derivado das plaquetas

QC-PCR – “Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction”

Rb - retinoblastoma

Rep – replicação

shRNA – “Small Hairpin RNA”

SVV – Setor de vetores virais

Tert - transcriptase reversa da telomerase

TGF- β - fator de crescimento de transformação

TK – “Thymidine kinase”

TQ - Timidina quinase

VZV- Vírus Varicela Zoster

5- aza - 5 - azacitidina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Ciclo celular em doenças proliferativas.....	17
1.2 Terapia gênica.....	22
1.3 Utilização do promotor gênico de E2F-1 em vetores de transferência gênica.....	24
1.4 Vírus Adeno-associado.....	26
1.5 Transferência gênica com AAV.....	27
1.6 Integração e a resposta imune contra AAVr.....	29
1.7 Aplicações de AAVr em terapia gênica	30
1.8 Terapia gênica utilizando genes suicidas, como timidina quinase.....	32
2 OBJETIVO	36
2.1 Objetivos específicos.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Preparação dos plasmídeos.....	37
3.2 Construção dos vetores AAVr	37
3.2.1 AAVCMV-IpG.....	37
3.2.2 AAVCMV-LIG	38
3.2.3 AAVE2F-LIG.....	38
3.2.4 AAVCMV-TKIG	38
3.2.5 AAVE2F-TKIG	38
3.2.6 AAVE2F β -LIG	39
3.2.7 AAVE2F β -TKIG	39
3.3 Isolamento do promotor gênico E2F-1 utilizando PCR	39
3.4 Manutenção das linhagens celulares.....	40
3.5 Produção do vírus Adeno-associado	40
3.5.1 Transfecção com fosfato de cálcio	40
3.5.2 Coleta do estoque viral.....	41
3.5.3 Titulação.....	41
3.6 Caracterização funcional de AAV em cultura de células.....	42
3.6.1 Citometria de fluxo para detecção da expressão de eGFP	42
3.6.2 Análise de Luciferase	42
3.7 Ensaios com ganciclovir	43
3.8 Imunofluorescência (IMF) para detecção de TK.....	43
4 RESULTADOS	45
4.1 Construção dos vetores	45
4.1.1 Clonagem do vetor: AAVCMV-LIG.....	45
4.1.2 Clonagem do vetor AAVE2F-LIG	45
4.1.3 Clonagem do vetor AAVCMV-TKIG.....	46
4.1.4 Clonagem do vetor AAVE2F-TKIG	46
4.2 Ensaios funcionais para validar os vetores.....	48
4.2.1 Transfecção da linhagem HT1080.....	48
4.2.2 Transdução da linhagem HT1080	52
4.2.3 Visualização da proteína TK em células transduzidas	55
4.3 Observação do “efeito bystander”	56
4.4 Construção de vetores novos	58
4.4.1 Clonagem do vetor AAVE2F β -LIG	58
4.4.2 Clonagem do vetor AAVE2F β -TKIG	58
4.5 Ensaio para validar os novos vetores	60
4.5.1 Transfecção da linhagem HT1080.....	60
4.5.2 Transfecção na linhagem 293T.....	62
4.5.3 Transdução das células HT1080 com os 6 vírus.....	64
4.5.4 Visualização da proteína TK em células transduzidas com os 6 vírus.....	66
4.6 Ensaio dos 6 vírus para verificar a atividade de TK, na presença de ganciclovir.	67
5 DISCUSSÃO	69

6 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	83
ANEXO A - Mapa do vetor pAAV-MCS da Stratagene	83
ANEXO B - Mapa do vetor pIRES2-EGFP da Clonetch.....	83
ANEXO C - Mapa do vetor AAVCMV-IpG	84
ANEXO D - Mapa de restrição para confirmar o vetor AAVCMV-IpG	84
ANEXO E - Mapa do vetor FE2FLIGW	85
ANEXO F - Mapa do vetor AAVCMV-LIG	85
ANEXO G - Mapa do vetor AAVE2F-LIG.....	86
ANEXO H - Mapa do vetor pCLTK.....	86
ANEXO I - Mapa do vetor AAVCMV-TKIG	87
ANEXO J - Mapa do vetor AAVE2F-TKIG	87
ANEXO K - Mapa do vetor AAVE2Fβ-LIG	88
ANEXO L - Mapa do vetor AAVE2Fβ-TKIG	88

1 INTRODUÇÃO

O termo “ciclo celular” é utilizado para descrever o estado proliferativo de uma célula, as etapas envolvidas na sua preparação para divisão celular e o processo em que uma célula se divide em duas. As células-filhas, resultantes da divisão, devem possuir exatamente o mesmo material genético da célula mãe, sem nenhuma alteração que cause impacto na sua função gênica. A ocorrência de uma falha na manutenção do DNA e/ou danos causados por compostos químicos ou irradiação poderiam resultar na mudança permanente da sequência de DNA e na herança desta mutação na próxima geração de células. Dependendo da sequência que foi modificada, a mutação pode causar sérios danos, como a perda de função de um produto gênico ou a introdução de atividade inapropriada. Também, as mutações podem resultar na alteração do próprio ciclo celular, promovendo a proliferação e o acúmulo de novas mutações.

O câncer é uma doença que pode ser caracterizada pela perda de controle do ciclo celular, devido a uma série de mutações que se acumulam no DNA, sendo assim uma doença genética (mas não necessariamente hereditária). A caracterização desses genes é muito importante para o estudo dessa doença e também para o desenvolvimento de novas terapias para tratá-la ou preveni-la (PARMIGIANI; CAMARGO,2004).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (Inca), o câncer pode ser definido como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. As estatísticas mundiais mostram que no ano 2000, ocorreram 5,3 milhões de casos novos de câncer em homens e 4,7 milhões em mulheres, e que 6,2 milhões de pessoas morreram por essa causa (3,5 milhões de homens e 2,7 milhões de mulheres). A estimativa para 2010 é de que os casos de câncer aumentem.

A maioria dos casos (80%) está relacionada a fatores ambientais, como por exemplo, o tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, o ambiente ocupacional (indústrias químicas e afins) e radiação solar. São raros os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários, apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese. Um exemplo são os indivíduos portadores de retinoblastoma que, em 10% dos casos, apresentam histórico familiar deste tumor (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER).

Outra doença proliferativa, porém não maligna e que não envolve mutação gênica, é a reestenose. A reestenose pode ser definida como a proliferação celular nos vasos sanguíneos, que tem como consequência impedir o fluxo do sangue que ocorre algum tempo depois de uma intervenção cirúrgica para desobstrução do mesmo (como angioplastia ou ponte de safena). Fatores de crescimento e citocinas são os responsáveis pelo desenvolvimento da reestenose. O fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o fator de crescimento de transformação ($TGF-\beta$) são os responsáveis pela proliferação das células musculares lisas, causando a reestenose (BRITO; AMIJI, 2007).

O câncer e a reestenose são patologias distintas, mas tem em comum a hiperproliferação celular. Sendo assim, seria possível desenvolver uma estratégia terapêutica direcionada para o ciclo celular, trazendo benefícios para uma variedade de doenças proliferativas.

1.1 Ciclo celular em doenças proliferativas

O ciclo celular dos eucariontes é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M. G1 é a fase que ocorre antes da síntese de DNA e que conta com vários mecanismos de checagem para garantir que o ciclo celular pare no caso do genoma ter sofrido danos. A fase S é o período de duplicação do DNA, G2 é a fase pós-síntese e também serve como oportunidade para verificar se a célula deve ou não se dividir. A fase M é quando ocorre a divisão de uma célula em duas células filhas, ou seja, o processo de mitose (LODISH, H. et al., 1999).

As fases G1, S, G2 e M do ciclo celular normal representam uma progressão ordenada controlada por uma cascata de interações proteína-proteína, fosforilação e ativação gênica. Em células cancerosas, a perda de controle do ciclo celular é uma característica fundamental e universal (**Figura 1**). Também, doenças proliferativas, mas não malignas (como reestenose), são associadas com alterações transitórias do ciclo celular. Por este motivo, o ciclo celular representa um alvo atraente para terapia gênica de doenças proliferativas.

Na célula normal, a transição da fase G1 é controlada principalmente pela proteína retinoblastoma (Rb). Quando ativa, a Rb hipofosforilada sequestra vários fatores importantes para a promoção do ciclo celular, principalmente o fator de transcrição E2F-1.

Quando livre, E2F-1 ativa genes importantes para replicação do genoma e progressão para a fase S. Então, a ligação entre Rb hipofosforilada e E2F-1 inibe a progressão do ciclo celular (SHERR; MCCORMICK, 2002).

Figura 1 - Representação do ciclo celular de uma célula normal. Essa figura ilustra a complexidade desse mecanismo e o grande número de proteínas envolvidas nesse processo. Nossa discussão e projeto foca em E2F-1 e no seu papel na regulação do ciclo celular.

FONTES: TESSEMA, M.; LEHMANN, U.; KREIPE, H. Cell cycle and no end. *Virchows Arch*, v.444, p. 313-323, 2004.

Sinais de crescimento estimulam a fosforilação de Rb, resultando na liberação de E2F-1 e permitindo a progressão do ciclo celular. A fosforilação de Rb é realizada pelos complexos protéicos ciclina-CDK (*cyclin dependent kinases*). A inibição do complexo ciclina-CDK resulta na parada do ciclo celular. Na célula transformada, a perda dos inibidores de ciclina-CDK permite que a fosforilação de Rb ocorra desreguladamente. Alternativamente, a perda do gene Rb deixa E2F-1 livre para agir (SHERR; MCCORMICK, 2002).

Dois exemplos de inibidores de ciclina-CDK são p16INK4a (CDKN2A) e p21Waf1 (CDKN1A). A proteína p16INK4a se liga especificamente na proteína CDK4, inibindo a fosforilação de Rb e parando o ciclo celular na fase G1 (SHERR; MCCORMICK, 2002).

Em células tumorais, a perda de expressão de p16INK4a ocorre com frequência (no caso de gliomas, mais do que 60%) devido à metilação do promotor gênico ou deleção do gene em si (STRAUSS et al., 2002). A proteína p21Waf1 interage com todos os complexos ciclina-CDK e faz parte do complexo funcional, mas um excesso de p21Waf1 preferencialmente inibe o ciclo na fase G1 tardia via sua interação com CDK2 (SHERR; MCCORMICK, 2002). A ativação transcricional de p21Waf1 é mediada, em parte, por p53 (EL-DEIRY et al., 1993). A perda de atividade de p53 por mutação ou deleção leva a uma queda de expressão de p21Waf1. Então, na célula transformada, a frequente perda de p53 pode ter impacto no controle da fosforilação de Rb.

Uma característica típica de células em proliferação é a atividade da família de fatores de transcrição E2F. E2F foi originalmente identificado como um fator celular que ativa a expressão do promotor E2 do Adenovírus. A família E2F é composta por oito membros, E2F-1-8 que tem a capacidade de promover proliferação e também apoptose, constituindo um mecanismo bastante complexo e antagônico (**Tabela 1, Figura 2**) (CHEN; TSAI; LEONE, 2009).

Acredita-se que E2F-1, E2F-2 e E2F-3 são ativadores de transcrição e E2F-4 ao 8 são repressores. Todos os membros tem em comum um domínio protéico de ligação ao DNA. A sequência de DNA onde E2F-1 se liga foi originalmente identificada como TTCGCGC no promotor do gene E2 em Adenovírus. Os membros E2F-1 até E2F-6 necessitam se dimerizar com outra proteína, denominada DP1, DP2/3 ou DP4, para serem funcionais (MINATO et al., 2008) Já E2F-7 e 8 tem um domínio próprio de ligação no DNA, não precisando se ligar a proteína DP (TANEJA et al., 2008).

Tabela 1 - Desenvolvimento de defeitos em camundongos *knockout* para E2F

Genótipo	Fenótipo
E2F-1 ^{-/-}	Seleção negativa do timo, atrofia testicular e susceptibilidade para tumorigênese em diferentes tecidos
E2F-2 ^{-/-}	Desenvolvimento de doenças auto-imunes devido a defeitos hematopoiéticos.
E2F-1 ^{-/-} ; E2F-2 ^{-/-}	Desenvolvimento de insuficiência pancreática e diabetes.
E2F-3 ^{-/-}	Letalidade embrionária (E19,5)
E2F-1 ^{-/-} , E2F-2 ^{-/-} , E2F-3 ^{-/-}	Morte do embrião
E2F-4 ^{-/-}	Morte do neonato devido ao aumento de susceptibilidade para doenças oportunistas que resultam em defeitos crânio-faciais.
E2F-5 ^{-/-}	Curta sobrevida devido ao desenvolvimento de hidrocéfalo, resultante da superprodução de fluido cérebro-espinhal pelo plexo coróide.
E2F-6 ^{-/-}	Sobrevida normal com transformações homeóticas do esqueleto axial.
E2F-7 ^{-/-}	Não observado
E2F-8 ^{-/-}	Não observado
E2F-7 ^{-/-} , E2F-8 ^{-/-}	Morte do embrião

FONTE: Adaptado de CHEN; TSAI; LEONE, 2009.

Figura 2 - Representação da família E2F. Essa família é caracterizada pela presença do domínio de ligação no DNA (DBD). Os membros dessa família são divididos em ativadores (E2F-1-E2F-3) e repressores (E2F-4 – E2F-8). A maioria dos membros (E2F-1-E2F-6) necessita se ligar a proteína DP. Essa heterodimerização é feita pela leuzina zipper (LZ) e pelo domínio marked box (MB). Os membros ativadores pertencem a sequência sinal nuclear de localização (NLS) amino terminal, localizada ao lado do sítio de ligação ciclina A (CycA). E2F-4 e 5 apresentam sinais de exportação nucleares (NES) que fazem o transporte desses membros para o citoplasma. E2F-7 e 8 são produzidos por splicing do transcrito primário.
 FONTE: Adaptado de CHEN; TSAI; LEONE, 2009.

E2F-1 frequentemente se encontra ativo, livre e com expressão aumentada em células em divisão. O promotor gênico do gene de E2F-1 também é controlado de forma dependente do ciclo celular, e o controle deste promotor é mediado largamente pelo próprio E2F-1 (NEUMAN et al., 1994; STRAUSS et al., 2006). Por este motivo, espera-se encontrar o promotor gênico de E2F-1 ativo principalmente em células em divisão, como células tumorais. A atividade de E2F-1 pode ser considerada um indicador do processo proliferativo, abrindo um caminho para tratamento gênico.

1.2 Terapia gênica

Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante no final da década de 60 e início de 70, tornou-se possível a isolamento de genes e de seus cDNAs, identificação de sequências promotoras, construção de plasmídeos e vetores virais que poderiam ser usados para estudar as funções gênicas (STRAUSS, 2007). Porém, a capacidade de introduzir uma sequência de DNA em células alvo abre a possibilidade de utilizar esta tecnologia de forma terapêutica. A terapia gênica pode ser definida como a transferência de uma sequência de ácido nucléico para uma célula ou tecido para fins terapêuticos. Em termos gerais, é necessário definir três parâmetros para a elaboração de novas estratégias de terapia gênica: a identificação da doença, o transgene (cDNA ou miRNA, entre outras possibilidades) ideal para tratá-la e o meio para introduzir a sequência terapêutica na célula hospedeira (DAYA; BERNIS, 2008).

De forma geral, a terapia gênica é realizada somente quando uma abordagem tradicional é ineficaz para o tratamento de uma doença. Mas também, a patologia e etiologia da doença precisam ser bem definidas para a identificação do alvo do tratamento. A terapia gênica foi criada, inicialmente, para o tratamento de doenças monogênicas, ou seja, doenças originadas da alteração de um único gene. Assim, a correção da deficiência envolve a introdução de uma cópia selvagem do gene causador da doença (como por exemplo, Fator IX para hemofilia). Porém, atualmente, a maioria dos protocolos de terapia gênica é destinada para o tratamento de câncer, uma doença cuja origem envolve o acúmulo de várias mutações (STRAUSS; COSTANZI-STRAUSS, 2004). O gene terapêutico aplicado na terapia gênica do câncer deve interromper um mecanismo chave para a manutenção do tumor, como sua capacidade de proliferar ou duplicar seu DNA genômico.

Existem duas maneiras de ocorrer essa transferência gênica: *ex vivo*, em que as células seriam retiradas do paciente, modificadas, e transplantadas novamente para o paciente ou *in vivo*, em que o tratamento é feito diretamente no paciente. A transferência do gene pode ocorrer através da utilização de vetores não virais (como plasmídeo) ou vetores virais.

A utilização de um vetor viral implica na adequação de um vírus selvagem para servir como um meio de transporte (vetor) para o transgene. As modificações incluem a interrupção do sistema de replicação viral e a introdução de sequências regulatórias

apropriadas para controlar a expressão do transgene. Abordagens deste tipo se beneficiam dos mecanismos biológicos oferecidos pelo vírus para entrar na célula alvo e expressar a sequência terapêutica. A desvantagem desta abordagem é que a biologia do vírus poderia estar em conflito com seu uso como vetor. Por exemplo, integração (ou não) no genoma do hospedeiro ou indução de uma resposta imune contra proteínas virais. Os vírus mais utilizados (veja **Figura 3**) em protocolos de terapia gênica são Adenovírus, Retrovírus, Lentivírus e Vírus Adeno-associado entre outros (JONH WILEY, c 2009)

Muitas estratégias vem sendo estudas para controlar a expressão do vetor para um tipo específico de célula, ou que permitam a expressão do transgene apenas em certas condições. Isso seria possível através da utilização de um promotor condicional, que consegue diferenciar tecidos normais de tecidos neoplásicos através de microambientes, como hipóxia, ou atividade celular, como proliferação. Essa possibilidade de controlar a expressão do transgene gera um mecanismo de especificidade, tornando viável o tratamento de algumas doenças como o câncer, sem prejudicar as células normais (STRAUSS, 2007).

Figura 3 - Vírus mais utilizados em protocolos clínicos de terapia gênica. Esta figura mostra a porcentagem de protocolos clínicos que utilizaram esses vetores. Recentemente, o uso do vírus Adeno-associado vem crescendo.

1.3 Utilização do promotor gênico de E2F-1 em vetores de transferência gênica

Como citado anteriormente, umas das maneiras de gerar especificidade para terapia gênica seria através do uso de um promotor que controlasse a expressão do vetor em algumas condições. Nesse contexto o promotor do gene E2F-1, um promotor condicional, é específico para células em divisão, gerando uma expressão controlada enquanto o CMV não tem especificidade, é um promotor com expressão constante.

O promotor E2F-1 dirige a expressão do próprio gene E2F-1 constituindo um mecanismo de retroalimentação positiva e dependente do ciclo celular. A atividade de E2F-1 é considerada um marcador de atividade celular, já que para a progressão do ciclo E2F-1 se encontra ativo e livre de Rb. Assim várias estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas empregando o promotor E2F-1 para dirigir a expressão do gene terapêutico.

Primeiramente o promotor E2F-1 foi utilizado em um trabalho em 1997. Os autores inseriram este promotor em um vetor Adenoviral para dirigir a expressão de LacZ ou TK, mostrando que a expressão era limitada para células em divisão (STRAUSS et al., 2008).

Um desafio na terapia gênica do câncer seria atingir todas as células tumorais e as metástases, especialmente aquelas que não são visíveis, pois essas células tem a capacidade de continuar se proliferando, o que pode causar a morte do paciente. Nesse contexto a utilização de vírus oncolíticos, que poderiam destruir as células tumorais sem atingir as células normais, mesmo quando aplicado sistemicamente, vem sendo bastante explorada. Alguns grupos desenvolveram Adenovírus oncolíticos que fazem o controle transcricional por E2F-1 para ganhar especificidade pelas células tumorais. E1a deve inativar Rb para a replicação viral ocorrer, assim a expressão sob o comando do promotor E2F-1 só ocorreria em células onde não ocorresse a expressão de Rb, ou seja, células tumorais (TSUKUDA et al., 2002).

O trabalho de Johnson et al usou o promotor gênico de E2F-1 para controlar a expressão de E1a e E4, que teria um papel na replicação do Adenovírus Onyx-411. E4 tem papel na replicação viral, no transporte dos transcritos virais e também controla apoptose e transformação celular do hospedeiro. Assim, controlando a expressão de E1a e E4 o Onyx-411 foi aplicado sistemicamente em camundongos com câncer cervical e o vírus foi bem tolerado, reduziu o volume tumoral e levou a um aumento de sobrevivência (JOHNSON et al., 2002).

Esse mesmo vírus, Onyx-411, foi utilizado em outro trabalho para expressar um shRNA contra o oncogene Ras. Em um modelo animal para tratamento de tumor, o vírus, denominado Internavec, reduziu o volume tumoral em 85%. Esse modelo utilizou não só a via de E2F-1, mas também a via do oncogene Ras para matar as células tumorais (ZHANG et al., 2006).

O promotor da transcriptase reversa da telomerase (Tert) também foi utilizado para controlar a expressão de E1a em outros trabalhos, para gerar um mecanismo de especificidade onde o vírus só se replique nas condições de proliferação celular.

O trabalho de Li et al utilizou o promotor de E2F-1 para dirigir a expressão de E1a e Tert para dirigir a expressão de E1b, resultando em morte tumoral e especificidade (LI et al., 2005b). Ainda o trabalho de Ryan et al utilizou o promotor de E2F-1 para dirigir a expressão de E1a e Tert para dirigir a expressão de E4. Eles observaram que 80% dos animais tratados mostraram regressão completa do tumor (RYAN et al., 2004).

Em um trabalho já realizado no nosso laboratório inserimos o promotor gênico de E2F-1 em um vetor lentiviral, avaliamos a expressão de luciferase em células em divisão e comparamos com células carenciadas por soro. Foi observado que o promotor E2F-1 se encontrava ativo em células em divisão, mas essa atividade era menor em células carenciadas por soro, tratamento com drogas ou inibição por contato (STRAUSS et al., 2006).

Esses trabalhos demonstram a importância de E2F-1 em gerar especificidade, tornando-o importante no tratamento de doenças proliferativas como câncer e reestenose. Uma possível limitação para seu uso seria o fato de E2F-1 não se encontrar ativo apenas no tumor, mas sim em qualquer célula normal que esteja se dividindo. Para isso existem algumas medidas como, por exemplo, a utilização de um gene terapêutico (como TK) que possa gerar mais especificidade protegendo as células normais. Também, a aplicação do vírus diretamente na massa tumoral deve limitar sua exposição para células normais.

1.4 Vírus Adeno-associado

O vírus Adeno-associado humano foi descoberto em 1965 como uma contaminação de preparações de Adenovírus (GONCALVES, 2005). Essas pequenas partículas eram antigenicamente diferentes do Adenovírus. A replicação em cultura de células apenas era possível quando inoculado com Adenovírus, caracterizando o AAV como um vírus defectivo (ATCHISON; CASTO; HAMMON, 1965). O AAV pertence à família Parvoviridae, e devido à necessidade da co-infecção com um *helper*, foi classificado como membro do gênero *Dependovirus*. O AAV, que faz parte do grupo de vírus composto por DNA, está entre os menores vírus de fita simples e não envelopados.

Os vetores de vírus Adeno-associado recombinantes (AAVr) oferecem várias vantagens para ensaios de terapia gênica. Os AAVr são capazes de transferir, de forma estável, material genético para células diferenciadas sem toxicidade ou reação inflamatória aguda. Mesmo que os AAVr apresentem potencial para se integrar ao genoma do hospedeiro, isto não ocorre com frequência nos vetores recombinantes. Os AAVr também apresentam uma boa perspectiva para serem utilizados em tratamentos sistêmicos. Atualmente, 71 protocolos clínicos adotaram AAVr como vetor terapêutico (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>), um número que tende a crescer rapidamente.

Até hoje, 12 sorotipos de AAV selvagem foram identificados. Um ponto importante é que os AAV não são patogênicos, e este fato reforça a expectativa de utilizar estes vetores recombinantes com segurança. O genoma do AAV2 selvagem (sorotipo 2) possui 4679 bases de DNA fita simples que codificam para duas importantes famílias de proteínas, denominadas Rep e Cap (**Figura 4**). O genoma do AAV é flanqueado por ITRs (*inverted terminal repeats*) que são ricos em G-C e formam uma estrutura secundária via sequências palindrômicas. Os ITRs regulam a replicação do genoma viral e direcionam sua integração (LU, 2004). Os AAVs estão entre os menores vírus, com um diâmetro de 18-26 nm.

Figura 4 - Estrutura viral e genômica do vírus selvagem. Vírus Adeno-associado: vírion e genoma pequeno, o genoma de DNA é de fita simples com estrutura secundária no ITRs.

Utilizando AAV2 como exemplo do ciclo de vida de AAV, o AAV2 reconhece a célula-alvo via interação com receptores celulares, HSPG, FGFR1 e a integrina $\alpha\beta 3$. Diferentes sorotipos interagem com receptores específicos, gerando tropismo para tecidos alvo. O vírion entra via endocitose e o genoma viral é liberado. No núcleo, a fita complementar do genoma é sintetizada, e em seguida ocorre a replicação, possível integração e expressão dos genes virais.

As proteínas Rep participam do processo de replicação e facilitam a integração do AAV no genoma do hospedeiro. As proteínas do grupo Cap são estruturais e responsáveis pela construção da cápsula viral. A presença das proteínas Rep e Cap não é suficiente para a replicação do AAV e os fatores que complementam a maquinaria de replicação são fornecidos pelo *helper virus*, através da co-infecção com Adenovírus selvagem ou *herpes simplex virus* (sendo um processo lítico). Na ausência do *helper virus*, os AAV entram no ciclo latente e se integram preferencialmente na região AAVS1, localizada na banda cromossômica 19q13.3-qter. A integração do vírus neste sítio não é conhecida por interferir no crescimento ou na expressão gênica das células hospedeiras (LU, 2004).

1.5 Transferência gênica com AAV

A construção de vetores recombinantes derivados de vírus Adeno-associado (AAVr) requer três componentes essenciais: o genoma viral onde o cassete de expressão será codificado, os genes virais (Rep e Cap) e as funções do *helper* vírus. Estes componentes

são separados em vários plasmídeos e o AAVr é incapaz de replicar. Atualmente, poucos produtos comerciais que facilitam a construção e produção de AAVr estão disponíveis.

O genoma viral é manipulado sob forma de plasmídeo onde os elementos mínimos do AAV foram inseridos (**Figura 5**). O empacotamento deste genoma implica em que a replicação viral seja incapacitada mesmo num caso fortuito do AAVr encontrar Ad selvagem na célula-alvo. O genoma recombinante possui os ITRs flanqueando o cassete de expressão. Em geral, o cassete de expressão inclui um promotor, o cDNA e um sinal de poliadenilação, permitindo a expressão do transgene sob comando de um promotor de nossa escolha. O pequeno genoma do AAVr, contudo, limita o tamanho total do cassete de expressão para aproximadamente 4.7 kb. Esta limitação induziu a criação de sistemas avançados de engenharia para dividir o transgene em dois vetores AAVr e recapitular seu transcrito de forma integral na célula transduzida (GONCALVES, 2005).

O protocolo original de produção de AAVr utiliza a co-transfecção das células 293T com o genoma viral e um segundo vetor que codifica as proteínas Rep e Cap, sob controle de um promotor heterólogo sem a sequência ITR. Desta forma, as proteínas Rep e Cap são excluídas do vírus recombinante maduro. O passo seguinte é a infecção das células 293T com um *helper virus*, que pode ser Ad ou HSV. O problema deste sistema é que as preparações virais contém dois vírus diferentes, o AAVr e o *helper virus*. Preparações puras do rAAV de interesse são obtidas após inativação do *helper virus* com calor e posterior separação do AAVr por meio de ultracentrifugação em gradiente de CsCl (GONCALVES, 2005; LU, 2004). Claramente, este é um processo laborioso, e ainda assim existe a possibilidade de contaminar as preparações de AAVr com o *helper virus*.

Nos AAVr de última geração, um mínimo de sequências complementares fornecidas pelos *helper virus* são inseridas num vetor plasmidial (**Figura 5**). A co-transfecção dos plasmídeos codificando o genoma viral, proteínas AAV e proteínas complementares em células 293T é suficiente para reconstituir a replicação viral. Desta forma, as preparações de AAVr ficam livres da contaminação com *helper virus*. Após ultracentrifugação, os preparados de AAVr podem atingir títulos superiores a 10^{12} partículas virais/ml. Um dos problemas da produção em larga escala de AAVr é a toxicidade da proteína Rep, que inviabiliza o estabelecimento de linhagens produtoras de AAVr estáveis. Assim, a produção

de AAVr é transitória e requer a co-transfecção das células produtoras com vários plasmídeos diferentes.

A titulação de AAVr pode ser realizada por ensaios biológicos, como por detecção do transgene. Alternativamente, ensaios mais precisos, como PCR- quantitativo- competitivo (QC-PCR), podem ser aplicados para detectar a presença do genoma AAVr (LU, 2004).

Figura 5 - Vetores e produção de AAVr. (A) Representação esquemática dos plasmídeos utilizados para produção de AAVr. O cassete de expressão é flanqueado por ITRs e os genes Rep e Cap (do AAV) e E2, E4 e VA (do Ad) são fornecidos em um ou mais plasmídeos. (B) A produção de AAVr depende de transfecção transitória das seqüências em células 293T. Funções de Ad E1A e E1B são necessárias e fornecidas pela 293T. Partículas virais se acumulam no núcleo e posteriormente são recolhidas e purificadas via gradiente de cloreto de cério ou cromatografia em coluna.

1.6 Integração e a resposta imune contra AAVr

A transdução por AAVr pode ocorrer via integração do genoma no locus cromossômico AAVS1, pela presença de formas episomais do genoma (concatamerizadas em formato linear ou circular) ou via recombinação homóloga com seqüências cromossômicas (que poderia ocasionar deleções ou re-arranjos no DNA do hospedeiro). A inserção do AAVr no genoma do hospedeiro ocorre numa frequência de 0,05% (1 vez em cada 2000 células). Para se integrar, o AAVr depende da presença de quebras no DNA celular e dos processos relativos ao seu reparo em decorrência da ausência de uma integrase

viral. Um estudo analisando os sítios de integração demonstrou um padrão não aleatório, com preferência para certos cromossomos, e especialmente ilhas de CpG, e dentro de um alcance de 1 kb do início do gene. Mesmo assim, o AAVr não demonstrou preferência para cromatina, sendo ativamente transcrito (MILLER et al., 2005).

Até agora, o impacto destes eventos de integração não são conhecidos, existindo a expectativa de que o AAVr possa representar uma alternativa mais segura do que o Retrovírus para tratamentos crônicos. A expressão do transgene é extremamente estável em vetores de AAVr. Dado a integração pouco frequente, a expressão sustentada resulta predominantemente da replicação de formas episomais do genoma AAVr na célula transduzida (LU, 2004).

A presença de AAVr no organismo pode provocar uma resposta imune, mas sem o perfil agudo observado com o Adenovírus. No caso do AAVr, a transdução não resulta em ativação da resposta inata. A resposta específica, incluindo humoral e celular contra antígenos do capsídio ou o próprio transgene, não ocorre em todos os casos. A gravidade da resposta é relacionada à pré-existência de anticorpos contra AAV, ao tecido alvo, dose de vírus, rota de administração, promotor, transgene e a doença a ser tratada. A falta de uma resposta permite que a expressão do transgene ocorra de forma sustentada, entretanto, uma resposta imune pode resultar na eliminação de células transduzidas e a perda da expressão do transgene. A re-administração do AAVr pode ser ineficiente por causa da resposta imune, necessitando de troca do sorotipo utilizado de AAV2 para AAV5, por exemplo. (ZAISS; MURUVE, 2005).

Os mecanismos de resposta imunológica contra o AAV podem acontecer de duas maneiras: primeira, uma resposta mediada pelas células, em que ativação de células T citotóxicas levaria à eliminação das células transduzidas; segundo, uma resposta humoral, na qual seriam produzidos anticorpos neutralizantes (Nab). Não foi observada resposta imunológica inata (DAYA; BERNIS, 2008).

1.7 Aplicações de AAVr em terapia gênica

O amplo tropismo, capacidade de transduzir células pós-mitóticas ou terminalmente diferenciadas, baixa frequência de integração, resposta imune moderada, alto título e

expressão sustentada são características do AAVr que contribuem para a perspectiva de sua aplicação segura e bem sucedida em uma variedade de estratégias de terapia gênica.

Um aspecto interessante do AAVr é seu potencial para aplicações sistêmicas. Recentemente, o tratamento de distrofia muscular num modelo animal mostrou que administração sistêmica de AAVr resultou na transferência do gene terapêutico de forma global e com benefício terapêutico (DENTI et al., 2006). Outra característica notável é o transporte retrógrado do AAVr após transdução de células musculares. Esta propriedade pode ser útil para o tratamento de neuropatologias (PIROZZI et al., 2006).

O tratamento de fibrose cística com AAV gerou resultados positivos. Essa doença é caracterizada pela inativação, por mutação, no regulador transmembrana de fibrose cística (CFTR), causando o aumento das secreções e, como consequência, aumento de infecções pulmonares (DAYA; BERNIS, 2008). Neste exemplo, o AAV foi utilizado como portador do cDNA para CFTR em 25 pacientes com fibrose cística. Foi observado que não ocorreram efeitos adversos devido à administração do vetor, mas os pacientes que receberam altos títulos do vírus desenvolveram anticorpos neutralizantes contra o capsídeo viral (FLOTTE et al., 2003).

Um trabalho publicado na Nature em 2006 mostrou o tratamento da Hemofilia B em um protocolo clínico de fase 1/2. Nesse trabalho foi utilizado o AAV-2 para transduzir os hepatócitos com o fator IX de coagulação, resultando em uma expressão do transgene limitada a um período de 8 semanas devido a resposta imune dos pacientes. Entretanto, o nível de expressão do fator IX foi suficiente para fornecer benefício clínico (MANNO et al., 2006).

O tratamento da Amaurose Congênita de Leber (ACL) por terapia gênica mediado por AAVr tem ganhado bastante atenção na literatura e na imprensa. A ACL é uma doença hereditária incurável que leva a cegueira e pode ser caracterizada pela mutação do gene RPE65. Nessa doença as células fotorreceptoras, cones e bastonetes, não regeneram os pigmentos visuais e assim a visão não é mantida. Três protocolos clínicos foram feitos para estudo e tratamento dessa doença e atualmente vem sendo bastante discutidos. O grupo de Bainbridge utilizou o rAAV-CB-hRPE65 para restaurar a visão em pacientes com essa deficiência, os resultados mostraram que não foi detectado toxicidade ou resposta imune e

todos os pacientes tiveram aumento da sensibilidade visual quando comparados ao controle (BAINBRIDGE; ALI, 2008).

O trabalho de Cideciyan et al descreveu a utilização do AAV2 carregando o cDNA para o gene RPE65. Nesse estudo eles queriam saber se os cones ou os bastonetes ou os dois seriam restaurados e se a melhora na visão seria explicada pelo nível de fotorreceptores que podem ser recuperados, questões que não tinham ficado claras em outros estudos. Três jovens adultos com Amaurose Congênita de Leber receberam o tratamento. Todos os pacientes apresentaram aumento da sensibilidade visual até 30 dias após o tratamento. Não houve mudança no efeito entre 30 e 90 dias, mostrando a recuperação dos fotorreceptores (CIDECIYAN et al., 2009).

O trabalho de Maguire também usou o AAV2-hRPE65. Doze pacientes com essa doença receberam uma injeção subretinal do AAV no pior olho durante 2 anos. O vírus foi tolerado e todos os pacientes tiveram melhora na visão (MAGUIRE et al., 2009; MAGUIRE et al., 2008).

Recentemente, em março de 2010, foi publicado mais um artigo pelo grupo de Amado et al. Depois dos protocolos anteriores sobre a ACL, ainda restaram algumas dúvidas, tais como o efeito imunológico no outro olho, a segurança em relação ao alto título de anticorpos contra o AAV2 e os benefícios da injeção. Para isso foram utilizados dois modelos animais, caninos e primatas, por serem parecidos com olhos de humanos. Eles aplicaram o rAAV2-hRPE65v2 no olho contralateral dos animais. Nenhum dos grupos experimentais (com a doença ou o controle) desenvolveu anticorpos contra o transgene, mas sim contra o capsídeo. A injeção causou uma pequena inflamação e melhorou a função visual nos animais afetados (AMADO et al., 2010).

Até hoje, a aplicação do AAVr em terapia gênica do câncer foi pouco explorada (17 protocolos clínicos) em comparação com Adenovírus (287 protocolos clínicos, <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>). Mesmo assim, o AAVr representa uma alternativa no desenvolvimento de novas estratégias de terapia gênica do câncer (LI et al., 2005a).

1.8 Terapia gênica utilizando genes suicidas, como timidina quinase

A utilização de genes suicidas/enzimas conversoras de pró-droga vem sendo bastante explorada em tratamentos de terapia gênica de câncer. Essa terapia, denominada

GDEPT (do inglês *gene directed enzyme prodrug therapy*), envolve a transferência de um cDNA que codifica uma enzima que não é tóxica, mas que é capaz de transformar uma substância que não tem efeito farmacológico, pró-droga, em uma substância com atividade anti-tumoral, droga. Por isso a denominação de gene suicida, pois a célula tumoral que expressa a enzima conversora acaba morrendo (PORTSMOUTH; HLAVATY; RENNER, 2007). Tipicamente, um vírus recombinante portador do cDNA do gene suicida é aplicado diretamente na massa tumoral e, posteriormente, várias doses da pró-droga são administradas sistemicamente.

A GDEPT apresenta algumas vantagens quando comparada ao tratamento com quimioterápicos. Primeiro, as pró-drogas não tem efeitos terapêuticos em células normais; segundo, a concentração da droga em sua forma tóxica é mais elevada no tumor do que em outros órgãos, já que a pró-droga é ativada apenas pelas células que foram transduzidas; terceiro, com o uso de um promotor específico, esse sistema gera uma especificidade para as células tumorais; quarto, a existência do “efeito *bystander*”, o que permite a morte das células vizinhas pela ação da droga ativada, mesmo que estas não tenham sido transduzidas (PORTSMOUTH; HLAVATY; RENNER, 2007). Diferentes genes podem ser utilizados nesse sistema. Os mais utilizados são: timidina quinase, citosina deaminase, citocromo P450 e nitroredutases (**Tabela 2**).

Nesse trabalho o gene utilizado é o HSV-TK (ou simplesmente TK). O gene TK, responsável pela produção da enzima timidina quinase no vírus do herpes, catalisa a monofosforilação da droga anti-herpes aciclovir ou ganciclovir (CHANG, 1995). Quinases celulares convertem a forma monofosfato da droga para a forma trifosfato, a qual competitivamente inibe a associação do deoxinucleosídeo trifosfato com a DNA polimerase, reduzindo a velocidade da síntese de DNA (**Figura 6**). Na prática, células infectadas com vírus que carregam o gene TK morrem quando expostas a pró-droga ganciclovir (ANDERSON, 1998; CHANG, 1995).

Outro fato interessante com a utilização de TK para tratamento de tumores vem da observação do efeito *bystander*, o efeito de destruir mais células do que as que foram transduzidas (CULVER et al., 1992). Modelos animais mostraram que 50% do câncer pode ser eliminado apenas com uma eficiência de transdução de 10% das células tumorais com o gene TK. A etiologia do efeito *bystander* não é completamente conhecida, a corrente

hipótese sugere que as formas fosforiladas da droga ganciclovir passam através das junções de comunicação do tipo *gap* para as células vizinhas (BI et al., 1993). *In vivo*, o efeito *bystander* pode ser limitado às células do tumor, desde que as células tumorais não estabeleçam junções *gap* com as células do tecido normal vizinho (MARIA; FRIEDMAN, 1997; PLAUTZ; NABEL; NABEL, 1991).

Tabela 2 - Tipos de genes suicidas

Enzima	Origem	Pró-droga	Droga
Timidina quinase	HSV, EHV, VZV	ACV, GCV, ara-M, BVDU	Formas trifosforiladas
Citosina deaminase	<i>E.coli</i>	5-FC	5-FU
Citocromo P450	Ratos, Humanos e Coelhos	CPA, IFO	Formas 4-Hidróxidos
Nitroreductase	<i>E.coli</i>	CB 1954	Derivados de N-acetóxidos

ACV- aciclovir; **ara-M**- arabinose 6-metóxi purina; **BVDU**- (E)-5-(2-bromovinil)-2'-deoxiuridina; **CPA**- ciclofosfamida; **HSV**- Vírus da Herpes; **EHV**- Vírus da Herpes Equina; **GCV**-ganciclovir; **IFO**- ifosfamida; **5-FU**- 5-fluoracil; **5-FC**- 5-fluorocitosina; **VZV**- Vírus Varicela Zoster

FONTE: PORTSMOUTH, D.; HLA VATY, J.; RENNER, M. Suicide genes for cancer therapy. **Mol Aspects Med**, v. 28, p. 4-41, 2007.

Figura 6 - Conversão de ganciclovir em ganciclovir trifosfato. O vírus da Herpes Simplex, que codifica a transcrição da enzima timidina quinase (VHS-TQ) cataliza a monofosforilação de pró-fármacos baseados em guanosina, como o ganciclovir. Quinases celulares convertem a forma monofosfato da droga para a forma trifosfato, a qual competitivamente inibe a associação do deoxinucleosídeo trifosfato com a DNA polimerase, reduzindo a velocidade da síntese de DNA .

FONTE: Retirado de BLAU; MENEGON; CHUNG, 2006.

Talvez a principal limitação associada com a GDEPT é a necessidade de transferir o gene suicida para a célula alvo. Por este motivo, é importante utilizar um vetor que atinja um alto nível de transdução *in vivo* sem efeitos colaterais. Os vetores adenovirais são

comumente utilizados e hoje 48 protocolos clínicos foram realizados utilizando esta estratégia (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>). Uma limitação potencial com o uso de Adenovírus é a resposta imune contra antígenos virais que poderia restringir a quantidade de vírus aplicado. Em comparação, o vetor AAVr também oferece transdução eficiente *in vivo*, mas não provoca uma resposta imune aguda sendo uma alternativa interessante.

2 OBJETIVO

O objetivo do projeto foi montar um vetor AAVr com expressão controlada por E2F-1 para direcionar a expressão do transgene, TK, para células em divisão. Para isso, o cassete bicistrônico TK-IRES-GFP (TKIG) foi inserido para fornecer o gene de interesse e eGFP simultaneamente sob comando do promotor E2F-1 nos vetores AAVr. Como controle foi utilizado o cassete bicistrônico luciferase-IRES-GFP (LIG) e/ou o promotor constitutivo CMV.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse projeto foram: 1) construção dos vetores AAVr; 2) produção e titulação dos estoques virais; e 3) a caracterização funcional dos vetores em cultura de células.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir descrição dos materiais e métodos utilizados durante a elaboração desse trabalho para chegar aos resultados apresentados aqui.

3.1 Preparação dos plasmídeos

Os plasmídios foram preparados 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 (SAMBROOK; FRITCSH; MANIATIS, 1989).

3.2 Construção dos vetores AAVr

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 (SAMBROOK; FRITCSH; MANIATIS, 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). Após a clonagem, as novas construções foram analisadas, por mapa de restrição. Todos os clones bacterianos foram guardados em estoque de glicerol, mantido a -70°C.

3.2.1 AAVCMV-IpG

O cassete IRES/EGFP foi retirado do vetor pIRES2-eGFP (Clontech). Este vetor foi digerido com a enzima *NotI* e posteriormente o DNA foi precipitado, lavado e ressuspensionado em preparação para a próxima etapa. Em seguida, este plasmídeo foi cortado com *HindIII* e a banda de 1.4 kb foi isolada do gel de agarose utilizando um kit comercial (Eppendorf). Em paralelo, o vetor AAVCMV-MCS (Stratagene) foi tratado com *NotI* e seguido por digestão com *HindIII*. Após a incubação do inserto e vetor na presença de T4 DNA ligase, uma parte da reação foi utilizada para transformação em bactéria DH5 α . O plasmídeo foi isolado de cada colônia obtida (mini-prep), e posteriormente foi feito um mapeamento, utilizando-se enzimas de restrição. Análise das colônias obtidas revelou a

presença do inserto. Um clone que representa o novo vetor, AAVCMV-IpG, foi escolhido e utilizado em ensaios posteriores.

3.2.2 AAVCMV-LIG

Para completar o IRES-parcial contido no vetor AAVCMV-IpG e, simultaneamente, inserir o cDNA de luciferase, o vetor AAVCMV-IpG foi digerido com *HindIII* e uma parte foi tratada com CIAP. O vetor FE2FLIGfW (**Anexo E**), construído em nosso laboratório (STRAUSS et al., 2006), foi digerido com *HindIII* e uma banda de 2.0 kb foi isolada em gel de agarose. Esta banda representa o cDNA de luciferase e também a mesma porção do elemento IRES que estava faltando no vetor AAVCMV-IpG. Ligação e análise de clones resultaram na identificação do novo vetor AAVCMV-LIG.

3.2.3 AAVE2F-LIG

Primeiramente o vetor AAVCMV-LIG foi digerido com *MluI* e *ClaI*, para retirar o promotor CMV e a sequência intrônica. O inserto, sendo o promotor gênico de E2F-1, foi obtido a partir da reação de PCR onde o vetor FE2FLIGW foi utilizado como molde e utilizando iniciadores oligonucleotídeos contendo sítios de restrição (descrito a seguir), onde a banda de 350pb foi amplificada, isolada e digerida com *MluI* e *ClaI*. Ligação e análise de clones resultaram na identificação do novo vetor AAVE2F-LIG.

3.2.4 AAVCMV-TKIG

O vetor AAVCMV-LIG foi digerido com *EcoRI* para retirada do gene luciferase. O inserto foi obtido pela digestão do vetor pCLTK (fornecido por MC Bajgelman, SVV, InCor, FMUSP), também com *EcoRI*, e a banda de 1,1kb contendo o cDNA de TK foi isolado. Posteriormente, uma parte deste vetor foi tratada com *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP, New England Biolabs). Ligação e análise de clones resultaram na identificação do novo vetor AAVCMV-TKIG.

3.2.5 AAVE2F-TKIG

O vetor AAVE2F-LIG foi digerido com *EcoRI* para retirar o fragmento de 2,0kb referente ao gene luciferase. Posteriormente o vetor AAVCMV-TKIG foi cortado com

EcoRI para isolar o fragmento de 1,1kb referente ao gene TK. Ligação e análise de clones foram feitas, identificando o novo vetor AAVE2F-TKIG.

3.2.6 AAVE2F β -LIG

O vetor AAVCMV-LIG foi cortado com *SstII*, foi realizado a reação *fill in* e posteriormente cortado com *MluI* liberando um fragmento de aproximadamente 660 pb, referente ao promotor CMV, restando o cassete β -LIG. Posteriormente o vetor AAVE2F-LIG foi cortado com *EcoRI*, foi realizado a reação *fill in* e posteriormente cortado com *MluI*, liberando o fragmento referente ao promotor E2F e esta banda foi isolada. Ligação e análise dos clones foram feitas, identificando o novo vetor AAVE2F β -LIG.

3.2.7 AAVE2F β -TKIG

O vetor AAVE2F β -LIG foi digerido com *EcoRI* liberando um fragmento de 1974 pb referente a luciferase. O vetor foi tratado com CIAP e isolado de gel de agarose. Em seguida o vetor AAVE2F-TKIG foi cortado com *EcoRI*, liberando um fragmento de 1150 pb, referente a TK, que foi isolada. Ligação e análises de clones foram feitas e o vetor AAVE2F β -TKIG foi identificado.

3.3 Isolamento do promotor gênico E2F-1 utilizando PCR

A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 μ l, contendo 2,5 μ l de tampão 10x, 0,5 mM de $MgCl_2$, 50 pmol de primer forward, 50 pmol de primer reverse, 1 unidade de Platinum Taq (Invitrogen) e H_2O até completar o volume.

A amplificação foi realizada em termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler sob as seguintes condições: denaturação inicial de 95°C por 5 min, extensão final 72°C por 5 min e 35 ciclos de denaturação a 95°C por 5 min, anelamento a 58°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. O produto da amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose, 1%, corado com brometo de etídio e visualizado por fotografia digital. Primers descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Primers utilizados para amplificação do promotor gênico de E2F-1

Oligo	Sequência
E2F Mlu F	5' GAT CAC GCG TGG TAT CAT CCG GAC AAA GCC TGC G 3'
E2F Cla R	5' GTA CAT CGA TGC AGG GCT CGA TCC CGT CTC C 3'

3.4 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens 293T (derivada de células de rim embrionário humano) e HT1080 (fibrosarcoma humano) foram mantidas no meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro de bezerro 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 e com 5% de CO₂.

3.5 Produção do vírus Adeno-associado

A produção de AAVr foi realizada a partir de três plasmídeos: pAAVCMV-MCS (o vetor de transferência que fornece o genoma viral a ser encapsulado na partícula viral), pAAV-RC (que codifica os genes rep e cap de AAV sorotipo 2) e pHelper (que codifica os genes adenovirais necessários para suportar a replicação de AAV). Os vetores foram obtidos no kit comercial "AAV Helper-Free System" (Stratagene). Como descrito acima, o vetor pAAVCMV-MCS foi modificado com a inserção de genes de interesse. O kit inclui o vetor de transferência pAAV-LacZ como controle.

3.5.1 Transfecção com fosfato de cálcio

A co-transfecção dos três plasmídeos foi feita por precipitação com fosfato de cálcio em células 293T mantidas em meio DMEM com 10% de soro de bezerro bovino. Protocolo adaptado de Naviaux et al. (1996). As células foram semeadas, com 24h de antecedência, 7,5 x 10⁵ células da linhagem 293T para transfecção em placas 6,0 cm. O DNA foi misturado em 250µL de cloreto de cálcio 0.25M, e precipitado com a adição de 250µL 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. Após 72h a coleta viral pode ser realizada

3.5.2 Coleta 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 x g por 5 min. para descarte das células, e o sobrenadante restante é alicotado e guardado a -70°C.

3.5.3 Titulação

Para cada vetor AAVr, 10µl de preparação viral foi diluída em 78,5µl de água e 0,5µl de DNaseI e 10µl de tampão foram adicionados antes de incubar a 37°C durante 30 minutos. Após o tratamento, a DNase foi inativada por temperatura a 65°C por 30 minutos e foi feita a extração por fenol clorofórmio e precipitação do DNA com etanol. O DNA foi ressuspenso em 100µl de água e a amostra foi denominada “concentrada”. Em paralelo, foi estabelecida uma curva padrão contendo um número conhecido de cópias de genoma viral. Para isto, foram feitas diluições seriadas do plasmídeo pAAVCMV-LIG de 10⁹ até 10¹ cópias por µl em água. As reações de PCR em tempo real foram montadas em um volume final de 15µl, sendo 10µl de syber, 0,32µl de primer Forward e 0,32µl do Reverse (na concentração 12,5pmol/µl, veja **Tabela 4**) e 4,36µl de água. Foi distribuído 15µl do mix na placa 96 poços e em seguida foi adicionado 5µl da amostra ou curva padrão. A amplificação das amostras foi analisada pelo software *7500 Software v2.0.1*. O cálculo do título viral foi feito com base nas diluições e comparação entre a amplificação das amostras e a curva padrão.

Tabela 4 - Primers utilizados para Titulação

Oligo	Sequência
Ires F	5' ATT TTC CAC CAT ATT GCC GT 3'
Ires R	5'CGA CAT TCA ACA GAC CTT GC 3'

3.6 Caracterização funcional de AAV em cultura de células

3.6.1 Citometria de fluxo para detecção da expressão de eGFP

Células HT1080 foram plaqueadas com 10^5 células por poço em placa seis poços. No dia seguinte, foram transduzidas com o sobrenadante viral e incubadas por 48h. Posteriormente, foram tripsinizadas, lavadas em PBS 1X e ressuspensas na concentração de 1×10^6 cel/ml em meio DMEM. A suspensão de células foi analisada utilizando-se citometria de fluxo (FACScalibur, Becton-Dickenson, CA, USA), revelando o número de células eGFP-positivas e a intensidade de atividade de eGFP, ambos medidos pelo software do aparelho.

3.6.2 Análise de Luciferase

Células HT1080 foram plaqueadas com 10^5 células por poço em placa seis poços. No dia seguinte, estas foram transduzidas com o sobrenadante viral (quantidade conforme descrito em cada experimento nos Resultados). As células foram então incubadas por 48h. Posteriormente as células foram lavadas em PBS 1X, tratadas com 500µl do reagente de lise (Promega). Após esse processo de lise as células foram centrifugadas (1min, 1000 x g, 25°C) e o sobrenadante coletado foi transferido para um tubo novo. As análises de luciferase e de proteína foram feitas a partir desse sobrenadante.

Para o ensaio de luciferase utilizou-se 50µl de solução de luciferina (substrato de luciferase, Promega) mais 10µl da amostra, que foi vortexada e analisada utilizando-se o equipamento para leitura *Monolight* 2010, avaliando-se a intensidade de emissão de luz (RLU, *Relative Light Units*).

A concentração de proteína foi analisada no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595nm. Para este experimento adicionou-se a um *eppendorf*, 800µl de água,

200µl de reagente *Bradford Protein Assay* (Bio-Rad) mais 2µl da amostra. Para a curva padrão, usamos 800µl de água, 200µl de corante e quatro amostras diferentes de albumina (BSA) com concentrações conhecidas.

Os valores obtidos no espectrofotômetro foram passados para análise em Microsoft Office Excel e utilizados para determinar a atividade de luciferase/µg.

3.7 Ensaios com ganciclovir

Efeito *bystander*

Células HT1080 foram plaqueadas com 5×10^5 células em placas 6cm 24h antes da transdução. No dia seguinte essas células foram transduzidas com 10^6 partículas dos vírus, (MOI de 2 - *Multiplicity of infection*), AAVCMV-LIG (HT-LIG) e AAVCMV-TKIG (HT-TK), durante 24h. Após a transdução essas células foram plaqueadas em placa 24 poços, com $2,5 \times 10^4$ células por poço. Durante o plaqueamento foi feito uma mistura de células HT1080 parental e HT-LIG ou HT1080 parental e HT-TK na razão 1:0, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9 ou 0:1. No dia seguinte essas células foram tratadas com ganciclovir 2,5mg/ml. Após três dias de tratamento essas células foram submetidas contagem ou, em paralelo, coloração com GIEMSA.

Avaliação dos 6 vírus

Células HT1080 foram plaqueadas com 1×10^5 células por poço em placas seis poços 24h antes da transdução. No dia seguinte essas células foram transduzidas com 10^6 partículas dos vírus, MOI de 10, AAVCMV-LIG, AAVE2F-LIG, AAV-E2FB-LIG, AAVCMV-TKIG, AAVE2F-TKIG, AAVE2FB-TKIG, durante 24h. Após a transdução as células foram plaqueadas com $2,5 \times 10^4$ células por poço (placa 24 poços) e 24h depois foram submetidas ao tratamento com ganciclovir 2,5mg/ml. Três dias depois essas células foram contadas ou, em paralelo, coradas com GIEMSA.

3.8 Imunofluorescência (IMF) para detecção de TK

Células HT1080 foram semeadas em lamínulas redondas (13mm) em placas de 24 poços com 5×10^4 células poço. As lamínulas foram previamente lavadas e esterilizadas por

autoclave. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas antes da transdução viral. Essas células foram transduzidas com os vírus e após 48h foram submetidas ao ensaio de IMF.

No preparo para IMF, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol 100% e lavadas novamente com PBS. Em seguida, as células foram bloqueadas com PBS albumina 1% a 25°C por 30' e lavadas com PBS. Incubação com anticorpo primário (policlonal anti TK produzido em coelho) diluído em PBS, foi realizada a 25°C por 1h, seguido por lavagem com PBS e incubação com o anticorpo secundário (anti-coelho conjugado com Cy3) diluído em PBS por 45 min a 25°C. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com Hoechst 33258 (20 µg/ml) por 30'. Após a lavagem final com PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas com glicerol 50% e seladas com esmalte.

4 RESULTADOS

4.1 Construção dos vetores

Para este trabalho foi utilizado o vetor pAAV-MCS da Stratagene (**ANEXO A**). A primeira etapa na construção dos vetores com expressão direcionada para células em divisão foi inserir os genes de interesse e o promotor gênico de E2F-1.

4.1.1 Clonagem do vetor: AAVCMV-LIG

Para a construção desse primeiro vetor tivemos que construir o sub-clone denominado AAVCMV-IpG. O cassete IRES/EGFP foi retirado do vetor pIRES2-eGFP (Clontech, mapa no **ANEXO B**). Esse vetor foi digerido com *NotI* e *HindIII* e a banda de 1.4kb foi isolada. Em paralelo, o vetor pAAV-MCS foi tratado com *NotI*, seguido por digestão com *HindIII*. Com esta estratégia de construção o elemento IRES foi inserido no novo vetor, mas faltou uma porção da sua extremidade 5' que foi introduzida na próxima etapa de clonagem. Assim, o primeiro vetor, que serviria de molde para os outros vetores propostos nesse projeto estava concluído. A montagem do vetor AAVCMV-IpG está apresentada nos **Anexos C e D**.

Posteriormente, para completar o IRES-parcial contido no vetor AAVCMV-IpG e, simultaneamente, inserir o cDNA de luciferase, o vetor AAVCMV-IpG foi digerido com *HindIII*. O vetor FE2FLIGfW (**ANEXO E**), construído em nosso laboratório (STRAUSS et al., 2006), foi digerido com *HindIII* e uma banda de 2.0 kb foi isolada em gel de agarose. Esta banda, que representa o cDNA de luciferase e também a mesma porção do elemento IRES que estava faltando, foi inserido no vetor AAVCMV-IpG. A montagem do vetor AAVCMV-LIG está apresentada na **Figura 7** e no **ANEXO F**.

4.1.2 Clonagem do vetor AAVE2F-LIG

O promotor gênico de E2F-1 foi isolado através de amplificação por PCR. Para isto, o vetor FE2FLIGfW (STRAUSS et al., 2006) serviu como molde e o produto foi posteriormente cortado com *MluI* e *ClaI*. O promotor E2F-1 foi inserido no vetor AAVCMV-LIG, também cortado previamente com *MluI* e *ClaI*, removendo o promotor CMV. A montagem do vetor AAVE2F-LIG está apresentada na **Figura 7** e no **ANEXO G**.

4.1.3 Clonagem do vetor AAVCMV-TKIG

O vetor pCLTK (**Anexo H**) foi cortado com *EcoRI* e a banda de 1,1 kb contendo o cDNA do gene timidina quinase (TK) foi isolado e em seguida inserido no vetor AAVCMV-LIG, previamente cortado com *EcoRI*. A montagem do vetor AAVCMV-TKIG está apresentada na **Figura 7** e no **ANEXO I**.

4.1.4 Clonagem do vetor AAVE2F-TKIG

O vetor AAVCMV-TKIG foi cortado com *EcoRI* e a banda de 1150pb (cDNA de TK) foi extraída do gel. Posteriormente o vetor AAVE2F-LIG também foi cortado com a enzima *EcoRI* e o fragmento referente a TK foi inserido no lugar do gene luciferase. A montagem do vetor AAVE2F-TKIG está apresentada na **Figura 7** e no **ANEXO J**.

Após a clonagem dos vetores todos foram confirmados através de mapeamento com enzimas de restrição, conforme mostrado na **Figura 8**. Os cortes esperados das enzimas estão representados na **Tabela 5**. Para exemplificar, foi escolhido como modelo a enzima *EcoRI*. O corte do vetor AAVCMV-LIG com essa enzima deveria apresentar duas bandas, uma de 2.0Kb, referente a luciferase, e outra de 5.7Kb representado o resto do vetor. O corte com a enzima *ClaI* deveria ser linear para os quatro vetores, porém nos vetores AAVE2F-LIG e AAVE2F-TKIG aparentemente este sítio não foi clivado. A nossa explicação para esse fato seria uma possível metilação no sítio de *ClaI*, já que esses vetores foram sequenciados e as sequências estavam corretas.

Figura 7 - Representação esquemática dos vetores. Desenho dos vetores indicando os promotores CMV (branco), E2F-1 (amarelo), o gene terapêutico TK (vermelho) e os genes repórter luciferase (azul) e eGFP (verde)

Figura 8 - Mapa de restrição dos vetores. Os vetores foram confirmados por mapa de restrição. O marcador utilizado foi o λ HindIII. Os tamanhos dos fragmentos liberados estão listados na Tabela 5. Os geis de agarose foram corados com brometo de etídeo e digitalmente fotografados.

Tabela 5 – Tamanho esperado das bandas liberadas após o corte dos vetores com as enzimas de restrição

	<i>Esperado*</i>			
	AAVCMV-LIG	AAVE2F-LIG	AAVCMV-TKIG	AAVE2F-TKIG
<i>MluI/ClaI</i>	196pb 7.5Kb	865pb 6.5Kb	1.169Kb 5.631Kb	350pb 5.650Kb
<i>MluI</i>	7.7Kb	7.4Kb	1.181Kb 5.619Kb	400pb 5.6Kb
<i>ClaI</i>	7.7Kb	7.4Kb	6.8Kb	6.0Kb
<i>HindIII</i>	2.0Kb 5.7Kb	2.0Kb 5.4Kb	1.205Kb 5.595Kb	1.898Kb 4.102Kb
<i>XbaI</i>	1.8Kb 5.9Kb	2.0Kb 5.4Kb	Não corta	Não corta
<i>BamHI</i>	7.7Kb	7.4Kb	Não corta	Não corta
<i>EcoRI</i>	2.0Kb 5.7Kb	1.9Kb 5.5Kb	1.150Kb 5.650Kb	1.150Kb 4.850Kb

* valor aproximado e feito com base nas informações disponíveis referente aos vetores das empresas ou que já havia no laboratório

4.2 Ensaios funcionais para validar os vetores.

4.2.1 Transfecção da linhagem HT1080

Antes de iniciar a produção de vírus, os plasmídeos foram transfectados em células HT1080 (fibrosarcoma humano) e, 48h depois, essas células foram submetidas a ensaios funcionais, como análise de luciferase, citometria de fluxo (FACS) e microscopia de fluorescência. A atividade de luciferase foi avaliada e demonstrou que a transfecção com o vetor AAVCMV-LIG foi correlacionada com a atividade de luciferase e 10-vezes mais forte do que visto com o vetor AAVE2F-LIG (**Figura 9**). Como esperado, nenhum sinal de luciferase foi detectado na presença dos vetores AAVCMV-TKIG ou AAVE2F-TKIG.

A expressão de eGFP foi detectada por citometria de fluxo e relatada de duas formas: a porcentagem de células eGFP-positivas e também a medida da intensidade relativa da fluorescência de eGFP (**Figura 10**). Assim, foi revelado que a transfecção dos vetores na célula HT1080 resultou na expressão significativa de eGFP somente a partir dos vetores AAVCMV-LIG e AAVCMV-TKIG. A **Figura 11** demonstra a mesma observação através do uso de microscopia de fluorescência para visualizar eGFP em células HT1080 transfectadas.

Com estes ensaios preliminares foi observado que a expressão a partir dos vetores com o promotor CMV foi confiável, porém a expressão dos genes repórter foi menos eficiente nos vetores com promotor E2F-1.

Figura 9 - Atividade de Luciferase após transfecção de células HT1080 com os plasmídeos indicados. As células HT1080 foram transfectadas com fosfato de cálcio e submetidas ao ensaio de luciferase 48h após a transfecção. O gráfico representa a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. Os valores representam a atividade de luciferase normalizada pela quantidade de proteína utilizada no ensaio. Consideramos 1 o valor obtido com o vetor AAVCMV-LIG .

Figura 10 - Análise da expressão de eGFP obtida pela transfecção de células HT1080 com os plasmídeos indicados. As células foram transfectadas com cloreto de cálcio e após 48h foram submetidas a análise por Citometria de Fluxo. (A) Intensidade de eGFP, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. (B) Número relativo de células eGFP positivas, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. Os gráficos representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 11 - Análise de eGFP por microscopia de fluorescência após a transfecção de HT1080. As células HT1080 foram transfectadas com os plasmídeos indicados na figura e a expressão de eGFP foi observada por microscopia de fluorescência 48h após a transfecção.

4.2.2 Transdução da linhagem HT1080

Foi feita uma produção dos quatro vírus e em seguida, células HT1080 foram transduzidas com 50µl de cada preparação viral e sujeitas a análise para detectar a expressão dos transgenes. Como visto nas **Figuras 12 e 13**, as atividades de luciferase e eGFP foram detectadas facilmente nos vetores AAVCMV, mas a expressão foi mais fraca a partir dos vetores AAVE2F. Neste ensaio, não tivemos conhecimento do título viral, então poderia ser possível que o volume da preparação utilizado no ensaio não tenha sido suficiente para resultar na transdução das células HT1080. Se for o caso, isto poderia explicar a falta de atividade dos genes repórter.

No próximo ensaio, uma quantidade crescente da preparação viral foi aplicada nas células HT1080 para determinar se um aumento na quantidade de vírus utilizada proporcionaria um aumento na atividade do gene repórter luciferase. Foi observado que o acréscimo de atividade de luciferase foi proporcional à dose de vírus utilizada, porém o nível de atividade de luciferase continua 100-vezes mais fraca a partir do vetor AAVE2F-LIG em comparação com o vetor AAVCMV-LIG, um resultado que ainda poderia ser relacionado com o título da preparação viral (**Figura 14**).

Figura 12 - Análise de Luciferase após a transdução de células HT1080. As células HT1080 foram transduzidas com os vetores e 48h após a transdução foram submetidas ao ensaio de luciferase. O gráfico representa a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. O valor representa a atividade de luciferase normalizada pela quantidade de proteína utilizada no ensaio e considerando o valor obtido com o vetor AAVCMV-LIG como 1.

Figura 13 - Análise da expressão de eGFP após transdução de células HT1080. As células HT1080 foram transduzidas com os 4 vetores e 48h após a transdução foram analisadas por FACS. (A) Intensidade de eGFP, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. (B) Número relativo de células eGFP positivas, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. Os gráficos representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 14 - Análise de Luciferase após transdução de células HT1080 com quantidades crescentes de preparação viral. As células HT1080 foram transduzidas com 5, 25, 50 ou 100μl dos vírus AAVCMV-LIG e AAVE2F-LIG e após 48h foram submetidas ao ensaio de luciferase. (A) Atividade de luciferase conferido pelo vírus AAVCMV-LIG. (B) Atividade de luciferase conferido pelo vírus AAVE2F-LIG. Nestes gráficos, os valores de atividade de luciferase são apresentados como RLU/μg de proteína. RLU, relative light units, conforme medido pelo luminômetro.

4.2.3 Visualização da proteína TK em células transduzidas

Células HT1080 foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência (IMF) para detecção de TK. Essas células foram transduzidas com os vírus AAVCMV-TKIG e AAVE2F-TKIG e, como controle negativo, os vírus AAVCMV-LIG, AAVE2F-LIG. Como visto na **Figura 15**, a presença de TK foi detectada tanto no núcleo quanto no citoplasma, de acordo com relatos da literatura (DEGREVE et al., 1998; LUO et al., 2007). Este ensaio confirma a eficiência do vetor AAVCMV-TKIG e está condizente com os ensaios anteriores de observação de eGFP.

Figura 15 - Detecção de TK por imunofluorescência após transdução. As células HT1080 foram transduzidas com os vírus AAVCMV-LIG, AAVE2F-LIG, AAVCMV-TKIG e AAVE2F-TKIG. As células foram fixadas e coradas 48h após a transdução e analisadas por microscopia de fluorescência. Em azul podemos observar a marcação de Hoechst 33258, utilizado para marcar o núcleo celular. Em vermelho observamos a presença de TK.

4.3 Observação do efeito *bystander*

Pensando no fato do vetor AAVCMV-TKIG parecer confiável, foi realizado um ensaio para revelar o esperado efeito *bystander* quando células são transduzidas com este vetor e tratadas com GCV. Para esse ensaio as células HT1080 foram transduzidas com os vetores AAVCMV-LIG, utilizado como controle, e com o AAVCMV-TKIG. Essas duas linhagens foram misturadas com HT1080 parental com diferentes porcentagens de cada, plaqueadas e posteriormente tratadas com ganciclovir. Três dias após o tratamento as células foram contadas e coradas (**Figura 16 e 17**). O efeito *bystander* pode ser observado quando apenas 10% de células carregando o TK resultou na morte de mais que 70% das células na presença de GCV. A morte de praticamente todas as células foi revelada quando somente 50% das células eram portadoras de TK e tratadas com GCV. Estes resultados confirmam o esperado efeito *bystander* e demonstram o bom desempenho do vetor AAVCMV-TKIG.

Figura 16 - Observação do efeito *bystander* após a contagem de células HT1080 viáveis. As células HT1080 foram transduzidas com os vírus AAVCMV-LIG, utilizado como controle, e AAVCMV-TKIG. Após 48h essas células foram misturadas com a linhagem HT1080 parental nas diferentes proporções, plaqueadas e submetidas ao tratamento com ganciclovir, após três dias as células viáveis foram contadas. GCV indica que a linhagem recebeu tratamento com ganciclovir. O gráfico representa a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. A porcentagem de células vivas, referente à condição AAVCMV-LIG (sem GCV e sem mistura) está apresentada no gráfico.

Figura 17 - Observação do efeito *bystander*. Em paralelo com o ensaio mostrado na Figura 16, as células foram coradas com GEMSA no terceiro dia após o tratamento com (+) ou sem (-) ganciclovir (GCV).

4.4 Construção dos vetores novos

Devido à baixa expressão dos vetores que apresentavam o promotor E2F-1, pensamos na diferença entre eles e os vetores com CMV, que apresentavam uma alta expressão, e vimos que a única diferença entre eles era a presença do íntron da β -globina, cuja presença promove translocação do transcrito para o citoplasma, podendo ser um diferencial.

Pensando nisso, resolvemos construir mais dois vetores contendo o íntron da beta globina justapositionado com o promotor E2F-1, denominados AAVE2F β -LIG e AAVE2F β -TKIG.

4.4.1 Clonagem do vetor AAVE2F β -LIG

O vetor AAVCMV-LIG (**Anexo F**) foi cortado com *Sst*II, sujeito a reação *fill in* e depois cortado com *Mlu*I e a banda de 7.0Kb, referente ao vetor, foi extraída do gel. Posteriormente o vetor AAVE2F-LIG foi cortado com a enzima *Eco*RI, sujeito a reação *fill in* e depois cortado com *Mlu*I e o fragmento referente ao E2F-1 foi isolado e inserido no lugar do promotor CMV. A montagem do vetor AAVE2F β -LIG está apresentada na **Figura 18** e no **Anexo K**.

4.4.2 Clonagem do vetor AAVE2F β -TKIG

O vetor AAVE2F β -LIG foi cortado com *Eco*RI e a banda de 5.4Kb, referente ao vetor foi extraída do gel. Posteriormente o vetor AAVE2F-TKIG (**Anexo J**) também foi cortado com a enzima *Eco*RI e o fragmento referente ao gene TK foi isolado e inserido no lugar do gene da luciferase. A montagem do vetor AAVE2F β -TKIG está apresentada na **Figura 18** e no **Anexo L**.

Após a montagem dos novos vetores foi feita a confirmação através do mapa de restrição, demonstrado na **Figura 19**. Os fragmentos esperados após a digestão com as enzimas estão representados na **Tabela 6**. Para exemplificar, foi escolhido como modelo a enzima *Eco*RI. O corte do vetor AAVE2F β -LIG com essa enzima deveria apresentar duas bandas, uma de 1.974Kb, referente a luciferase, e outra de 5.426Kb representando o resto do vetor. O corte com a enzima *Cla*I lineariza os dois vetores. Nestes, o sítio de *Cla*I não foi alterado durante a construção.

Figura 18 - Representação esquemática dos vetores. Montagem dos vetores indicando os promotores E2F-1 (amarelo), seguidos do intron da beta globina e o gene terapêutico TK (vermelho) ou o gene repórter eGFP (verde).

Figura 19 - Mapa de restrição dos vetores AAVE2Fβ. Os vetores foram confirmados por mapa de restrição. O marcador utilizado foi o λ HindIII (valor indicado em pares de bases, pb). Os tamanhos dos fragmentos liberados estão listados na Tabela 6. Os géis de agarose foram corados com brometo de etídeo e digitalmente fotografados.

Tabela 6 – Tamanho esperado para as bandas liberadas após corte dos vetores com as enzimas de restrição

	<i>Esperado*</i>	
	AAVE2Fβ-LIG	AAVE2Fβ-TKIG
<i>MluI/ClaI</i>	865pb 6.535Kb	865pb 5.635Kb
<i>MluI</i>	7.4Kb	6.5Kb
<i>ClaI</i>	7.4Kb	6.5Kb
<i>HindIII</i>	2.010Kb 5.390Kb	6.5Kb
<i>XbaI</i>	1.974Kb 5.426Kb	Não corta
<i>BamHI</i>	7.4Kb	Não corta
<i>EcoRI</i>	1.974Kb 5.426Kb	1.149Kb 5.351Kb

*valor aproximado e feito com base nas informações disponíveis referente aos vetores das empresas ou que já havia no laboratório

4.5 Ensaio para validar os novos vetores

4.5.1 Transfecção da linhagem HT1080

Para testar os novos plasmídeos, foi feito um ensaio de transfecção em células HT1080. Essas células foram submetidas a ensaios funcionais, 48h após transfecção, como análise de luciferase e citometria de fluxo. Como visto anteriormente, o vetor AAVCMV-LIG providenciou um alto nível de atividade de luciferase enquanto os vetores com promotor E2F-1, como ou sem o íntron, foram quase 100-vezes menos eficientes (**Figura 20**). A observação de eGFP também indicou que somente o promotor CMV foi confiável para dirigir a expressão deste gene repórter (**Figura 21**).

Figura 20 - Análise de luciferase após transfecção de células HT1080. Após a construção dos novos vetores foi feito um ensaio de transfecção com fosfato de cálcio. As células HT1080 foram transfectadas com os 6 vetores e 48h depois foram submetidas ao ensaio de luciferase. O gráfico representa a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. O valor representa a atividade de luciferase normalizada pela quantidade de proteína utilizada no ensaio e considerando o valor obtido com o vetor AAVCMV-LIG como 1.

Figura 21 - Análise da expressão de eGFP por citometria de fluxo após transfecção de HT1080. As células HT1080 foram transfectadas com fosfato de cálcio e após 48h foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Intensidade de eGFP, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. (B) Número relativo de células eGFP positivas, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. Os gráficos representam o médio e desvio padrão de três experimentos independentes.

4.5.2 Transfecção na linhagem 293T

Resolvemos testar a transfecção em outra linhagem além da HT1080, pensando na possibilidade do resultado variar de acordo com a linhagem. A linhagem 293T, derivada de células de rim embrionário humano, foram transfectadas com os vetores plasmidiais e sujeitas aos ensaios de luciferase e citometria de fluxo. Observamos que a expressão de luciferase e eGFP foi maior do que a atividade da linhagem HT1080 (**Figuras 22 e 23**), e a expressão dos vetores que apresentam o E2F como promotor também foi maior, porém ainda menor que o CMV, indicando que a expressão pode variar de acordo com a linhagem.

Figura 22 - Análise de luciferase após transfecção de células 293T. As células 293T foram transfectadas com os 6 vetores e 48h depois foram submetidas ao ensaio de luciferase. O gráfico representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes. Os valores representam a atividade de luciferase normalizada pela quantidade de proteína utilizada no ensaio e considerando o valor obtido com o vetor AAVCMV-LIG como 1.

Figura 23 - Análise da expressão de eGFP por citometria de fluxo após transfecção de 293T. As células 293T foram transfectadas com fosfato de cálcio e após 48h foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Intensidade de eGFP, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. (B) Número relativo de células eGFP positivas, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. Os gráficos representam o médio e desvio padrão de três experimentos independentes.

4.5.3 Transdução das células HT1080 com os 6 vírus

Foi feita uma nova produção de todos os vírus. Esses vírus foram titulados por PCR em tempo real e esta informação permitiu que a mesma quantidade de cada vírus fosse utilizada nos ensaios. Assim tentamos eliminar a possível variabilidade entre as produções de cada vírus. Células HT1080 foram transduzidas com MOI de 10 e, após 48h, a expressão dos genes repórter foi verificada (**Figura 24 e 25**). Observamos que o vírus AAVCMV-LIG proporcionou atividade de luciferase ainda 100-vezes mais forte do que os vetores contendo o promotor E2F-1 e independente da presença do íntron.

Condizente com os ensaios anteriores, o vetor AAVCMV-TKIG forneceu expressão de eGFP em aproximadamente 70% das células e com uma intensidade maior do que visto com o vetor AAVCMV-LIG. De novo, a detecção de atividade dos gene repórter foi dificultada nas células transduzidas com os vetores contendo o promotor E2F-1.

Figura 24 - Análise de Luciferase após transdução de células HT1080 com quantidades iguais dos seis vírus. As células HT1080 foram transduzidas com os vírus, utilizando-se um MOI de 10. Após 48h de transdução essas células foram submetidas ao ensaio de luciferase. O gráfico representa a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. Os valores representam a atividade de luciferase normalizada pela quantidade de proteína utilizada no ensaio e considerando o valor obtido com o vetor AAVCMV-LIG como 1.

Figura 25 - Análise da expressão de eGFP por citometria de fluxo de células HT1080 transduzidas com quantidades iguais dos seis vírus. As células HT1080 foram transduzidas com um MOI de 10 e, após 48h, foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Intensidade de eGFP, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. (B) Número relativo de células eGFP positivas, valor normalizado considerando a condição AAVCMV-LIG como 1. Os gráficos representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes.

4.5.4 Visualização da proteína TK em células transduzidas com os 6 vírus

Células HT1080 foram submetidas ao ensaio de IMF para detecção de TK. Essas células foram transduzidas com os 6 vírus, utilizando 10^6 partículas virais, sendo os vetores com cassete LIG utilizados como controle negativo. Como visto na **Figura 26**, a presença de TK foi detectada tanto no núcleo quanto no citoplasma, de acordo com relatos da literatura (DEGREVE et al., 1998; LUO et al., 2007). A presença de TK também foi detectada nos vetores AAVE2F-TKIG e AAVE2F β -TKIG, porém foi muito difícil encontrar um campo com uma célula positiva, enquanto que na observação do AAVCMV-TKIG havia muitos campos positivos. A contagem de 10 campos revelou a marcação para TK em 12, 0 ou 0,8% das células transduzidas com AAVCMV-TKIG, AAVE2F-TKIG ou AAVE2F β -TKIG, respectivamente. Este ensaio confirma a eficiência, já observada em ensaios anteriores, do vetor AAVCMV-TKIG.

Figura 26 - Detecção de TK por imunofluorescência após a transdução. As células HT1080 foram transduzidas com os 6 vírus, utilizando um MOI de 10. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência 48h após a transdução. As células foram fixadas e coradas 48h após a transdução e analisadas por microscopia de fluorescência. Em azul podemos observar a marcação de Hoechst 33258, utilizado para marcar o núcleo celular. Em vermelho observamos a presença de TK.

4.6 Ensaio dos 6 vírus para verificar a atividade de TK, na presença de ganciclovir.

Este ensaio foi o mais importante do trabalho, pois esperávamos que as células transduzidas com AAVE2F/E2F β -TKIG morressem na presença de ganciclovir, de acordo com o objetivo proposto nesse projeto.

As células HT1080 foram transduzidas com os 6 vírus, utilizando 10^6 partículas virais, plaqueadas em placa 24 poços e submetidas ao tratamento com ganciclovir. Três dias após o tratamento as células foram contadas e coradas com Giemsa. As células transduzidas com AAVE2F-TKIG não morreram na presença de GCV (**Figuras 27 e 28**). A transdução com o vetor AAVE2F β -TKIG resultou na morte de células tanto na presença quanto na ausência de GCV, talvez indicando uma toxicidade e/ou variabilidade no efeito deste vetor. Em contraste, as células transduzidas com AAVCMV-TKIG morreram na presença do GCV, mostrando mais uma vez a eficiência desse vetor, que poderá ser explorado futuramente.

Figura 27- Ensaio dos 6 vírus para verificar a atividade de TK. As células HT1080 foram transduzidas com os 6 vírus, utilizando 10^6 partículas virais, plaqueadas em placa 24 poços e submetidas ao tratamento com ganciclovir. Três dias após o tratamento as células viáveis foram contadas. Em azul as células transduzidas, mas sem tratamento com ganciclovir. Em roxo células tratadas com ganciclovir. O gráfico representa o médio e desvio padrão de 3 experimentos independentes. O número de células viáveis foi normalizado considerando a condição AAVE2F-LIG como 1.

Figura 28 - Observação do efeito bystander. Em paralelo com o ensaio mostrado na Figura 27, as células foram coradas com GEMSA no terceiro dia após tratamento com (+) ou sem (-) ganciclovir (GCV).

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento desse projeto ocorreu em duas etapas. A primeira etapa consistiu na clonagem dos quatro vetores propostos inicialmente, AAVCMV-LIG, AAVE2F-LIG, AAVCMV-TKIG, AAVE2F-TKIG e na avaliação desses vetores por ensaios funcionais. Esses ensaios revelaram uma surpresa, a baixa expressão dos vetores que tinham o promotor E2F-1. A segunda etapa do projeto envolveu a construção e caracterização de dois novos vetores portadores do promotor E2F-1 junto com o íntron da β -globina. Mas, os ensaios realizados nesta etapa tiveram o benefício da titulação das produções virais, assim permitindo que uma quantidade certa de vírus fosse aplicada nas células e facilitando a comparação de um vetor com outro. Mesmo com estes cuidados, a expressão dos vetores que apresentavam o promotor E2F-1 foi tão fraca que a atividade dos transgenes não foi detectada. Contudo, demonstramos que o vetor AAVCMV-TKIG foi confiável em sua expressão e habilidade de conferir morte celular na presença de GCV.

O desenho dos vetores contou com a inclusão de dois genes repórter, luciferase e eGFP. Inicialmente o gene repórter eGFP foi inserido nos vetores para auxiliar na titulação dos mesmos. Queríamos determinar o título a partir da contagem de células eGFP-positivas após a transdução com uma diluição da preparação viral, porém a dificuldade em observar a expressão de eGFP foi incompatível com este ensaio. O gene repórter luciferase foi usado para ensaios funcionais quantitativos por ser mais sensível. Mesmo assim, o eGFP acabou sendo usado em ensaios quantitativos e como contra-prova da atividade luciferase.

A capacidade de traduzir duas proteínas a partir de um único transcrito foi mediada pelo elemento IRES. O sítio de entrada interna do ribossomo (IRES) foi descoberto inicialmente em Picornavírus, pequenos vírus de RNA, posteriormente também foi identificado em outros vírus e mRNAs de células eucarióticas. O IRES é um elemento *cis-acting* que recruta subunidades menores do ribossomo ao códon de iniciação de forma independente do cap, permitindo a expressão de dois genes simultaneamente a partir de um transcrito único. Em outras palavras, o uso do elemento IRES permite a expressão de dois cDNAs a partir de um único promotor, abrindo a possibilidade de realizar ensaios funcionais (como TK/GCV) e repórter (como eGFP) com um único vetor (MARTINEZ-SALAS, 1999). Como visto nos ensaios apresentados aqui, a análise de Luciferase e eGFP foi consistente em HT10180, tanto na transfecção quanto na transdução dessa linhagem. A

detecção de TK por IMF também foi condizente com a detecção de eGFP. As análises de eGFP por citometria de fluxo demonstraram a eficiência e alta expressão do vetor AAVCMV-TKIG e seu controle AAVCMV-LIG e uma baixa expressão dos vetores que apresentavam o promotor E2F-1. Esses resultados foram confirmados com o ensaio de IMF, no qual a detecção de TK ocorreu facilmente para o vetor AAVCMV-TKIG, esse ensaio também revelou a dificuldade dessa detecção para o vetor AAVE2F-TKIG, ajudando a provar que a transdução era confiável e consistente com os resultados observados.

Inicialmente, tanto a medida da porcentagem de células eGFP-positivas quanto a sua intensidade eram importantes para nós, pois cada atividade revelava um aspecto distinto do funcionamento do promotor. O fato de terem poucas células positivas, porém com uma forte intensidade de eGFP, poderia mostrar o bom funcionamento do promotor, porém uma transdução pouco eficiente. Alternativamente, a ausência de sinal do transgene poderia indicar a fraqueza do promotor, mesmo com o vírus presente nas células. Estas possibilidades também apontavam a importância de ter conhecimento do título viral das preparações e a utilização do mesmo número de partículas virais (ou seja, o mesmo MOI) em cada experimento, um ponto que será discutido em detalhes a seguir.

Aparentemente, a baixa expressão dos vetores AAVE2F poderia estar relacionada ao título viral, levando ao questionamento da quantidade de vírus utilizada nos ensaios da primeira etapa deste trabalho. Será que teria sido suficiente para transduzir as células? E será que estávamos utilizando a mesma quantidade de todas as preparações virais?

Uma explicação alternativa para a baixa expressão dos vetores AAVE2F foi encontrada quando comparamos o desenho destes com os vetores AAVCMV. Além do promotor em si, a única diferença entre os vetores que apresentavam o promotor E2F-1 para o CMV era a presença do íntron da β -globina, então resolvemos montar os vetores com o íntron para fazer a comparação e tentar contornar o problema da baixa expressão, passando para a segunda parte desse projeto.

Após a clonagem dos novos vetores, AAVE2F β -LIG e AAVE2F β -TKIG a titulação foi feita e os novos ensaios revelaram que o problema ainda não havia sido resolvido. Os vetores com promotor de E2F-1 ainda apresentavam uma baixa expressão quando comparados ao CMV. Na linhagem HT1080, fibrosarcoma humano, os resultados da

transfecção e transdução foram consistentes. A porcentagem de células eGFP-positivas e também a medida da intensidade relativa da fluorescência de eGFP mostraram que o promotor CMV teve um melhor desempenho em dirigir a expressão dos transgenes. O ensaio descrito na **Figura 25** (transdução de HT1080 com os 6 vírus e utilizando o mesmo MOI) permitiu a comparação entre os vetores e indicou que o promotor CMV é 100 vezes mais forte que o promotor E2F-1. Assim, eliminamos a dúvida sobre a quantidade de vírus aplicada no experimento e mesmo na presença do íntron da β -globina, foi revelado que o promotor E2F-1 foi fraco demais para observar a expressão dos genes repórter.

A proposta original deste projeto incluiu um ensaio para testar a atividade de E2F-1 em células carenciadas por soro ou com tratamento de drogas que regulassem o ciclo celular. Infelizmente nós nem chegamos a testar, pois com a baixa expressão a partir do promotor E2F-1 revelada nos ensaios funcionais não conseguiríamos fazer o experimento de uma maneira confiável.

Nós não sabemos exatamente porque o desempenho do promotor E2F-1 foi tão baixo, mas talvez exista uma preferência por célula, já que os ensaios mostraram que a transfecção da linhagem 293T resultou em níveis de expressão facilmente detectadas nos ensaios repórter, enquanto a transfecção de células HT1080 resultou no contrário. Ainda não foi definido se esta diferença é diretamente relacionada com a presença da proteína E2F-1 ou seu parceiro DP-1 ou com outro fator não conhecido.

Em contraste, a transdução de células 293T foi inconsistente (e por este motivo não mostrado nesse trabalho), enquanto a HT1080 demonstrou ser uma linhagem permissiva para transdução com AAVr. Nós testamos varias linhagens disponíveis no laboratório (B16, NIH3T3, PC3, entre outras) e não encontramos uma linhagem tão permissiva para transdução quanto a HT1080. Ou seja, não tivemos a oportunidade de testar o desempenho dos vetores em uma outra linhagem além da HT1080 de forma confiável.

O motivo para a diferença entre linhagens permissivas ou não para a transdução com AAV vem da biologia do vírus. O genoma viral (DNA fita simples) precisa ser convertido em dupla fita antes de ser expresso. Este processo depende de fatores celulares e pode levar mais que 48 horas para ocorrer (GONCALVES, 2005). Talvez o tempo de incubação necessário para o vírus expressar varie entre as linhagens, levando a necessidade

da padronização de cada linhagem para determinar a melhor maneira de realizar a transdução.

Também não descartamos a possibilidade de que o problema poderia estar relacionado com a estrutura do genoma viral, ou seja, a função do promotor E2F-1 no contexto do vírus Adeno-associado poderia ser comprometida. Trabalhos prévios em nosso laboratório mostraram que este promotor é confiável, mas quando utilizado no vetor lentiviral (STRAUSS et al., 2006). Este trabalho mostra que o promotor E2F-1 não fornece um nível de expressão tão forte quanto o promotor gênico de ubiquitina-C (STRAUSS et al., 2006), então, já prevíamos que o promotor E2F-1 seria mais fraco que o promotor constitutivo CMV. Contudo, com base no trabalho do Lentivírus, acreditamos que o promotor E2F-1 poderia fornecer um nível adequado de expressão viral e o fato dessa expressão ter sido tão baixa no contexto do AAVr, foi uma surpresa.

Um baixo nível de expressão poderia ser tolerado se fosse suficiente para o transgene exercer sua função. Nos ensaios de luciferase, vimos que a expressão dos vetores AAVE2F foi detectável, porém com dificuldade em comparação ao vetor AAVCMV. Então, o ensaio decisivo foi o tratamento de células HT1080 com os vetores AAVE2F/ β -TKIG na presença de GCV. Mesmo sendo baixo, se o nível de expressão fosse suficiente para conferir a morte destas células, poderíamos confiar nos vetores AAVE2F. Porém, não foi observado a morte de HT1080 nesta condição, enquanto o vetor AAVCMV-TKIG proporcionou a morte maciça destas células. Com este ensaio concluímos que os vetores AAVE2F não oferecem um desempenho adequado.

Existem algumas opções para tentar solucionar os problemas observados com o uso do promotor E2F-1. Uma opção seria o uso de um promotor sintético. Em um trabalho feito por Lim et al, um promotor sintético de E2F-1 foi construído e apresentou resposta a proteína E2F-1 que foi de 5-8 vezes mais forte do que o promotor nativo. Em um modelo tumoral isogênico, vetores com o promotor sintético foram usados para dirigir a expressão de IL-2 e citosina deaminase e foram mais eficientes no controle do crescimento tumoral quando comparado com o promotor gênico de E2F-1. Segundo os autores o controle da atividade transcricional do promotor sintético permite maior expressão, principalmente em células onde Rb se encontra inativa, gerando maior especificidade para células tumorais (STRAUSS et al., 2008).

Nosso interesse no uso de um promotor ativo durante a divisão celular continua tanto para tratamento de doenças proliferativas quanto para a monitoração de proliferação celular.

Um trabalho publicado na *Nature Medicine* utilizou imagem bioluminescente para monitorar a formação de tumores *in vivo* e para medir sua resposta a terapia. Foi utilizado um modelo animal de glioma, onde o gene da luciferase seria controlado pelo promotor E2F-1 humano, para demonstrar por imagem a perda da via de Rb em células tumorais. Neste caso, animais transgênicos foram gerados a partir de um vetor plasmidial contendo o promotor E2F-1 dirigindo a expressão de luciferase. Eles demonstraram por imagem que a proliferação das células do glioma é dependente da ativação do receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas e da via de mTOR (UHRBOM; NERIO; HOLLAND, 2004).

Em outro trabalho, publicado em 2008, o grupo de Monfared utilizou um Retrovírus, Cis-E2F-TA-LUC-IRES-TKGFP, como um método não invasivo para analisar a atividade transcricional de E2F-1 *in vitro* e *in vivo*. Neste caso, foi utilizado um promotor sintético contendo 4 cópias do elemento responsivo a E2F-1 junto com um promotor mínimo. Utilizando esse vetor eles conseguiram monitorar os níveis da atividade de E2F-1 em resposta aos danos do DNA (MONFARED et al., 2008).

Outra abordagem seria o uso de um promotor ativo no tecido neoplásico (mas não necessariamente na condição de proliferação), como Tert ou Survivina. O promotor da Telomerase se encontra ativo em tumores com alta expressão de telomerase, o que representaria aproximadamente 90% de todos os cânceres. O trabalho de Li et al mostra a criação de um Adenovírus oncolítico CG5757, que tem E2F-1 e hTERT como promotores, para dirigir a expressão de E1a e E1b. Eles observaram que apenas as células tumorais expressaram E1a e E1b. O Adenovírus apenas replicou nas células tumorais, não afetando as normais. A segurança e grande eficiência desse vetor também foi vista *in vivo* (LI et al., 2005b).

Um outro trabalho utilizou o Adeno-associado com o promotor hTERT para dirigir a expressão de interferon- β (IFN- β). Eles queriam ver se o vetor AAV-hTERT-INF- β tinha um efeito de supressão tumoral em alguns modelos celulares e em um modelo animal de câncer colorretal e câncer de pulmão. Os resultados mostraram que o vetor expressava em

células tumorais e suprimia o crescimento tumoral, sem afetar as células normais. A apoptose foi induzida via caspase e ativação do citocromo c. A aplicação do vetor nos modelos tumorais de câncer coloretal e de pulmão em camundongos resultou na morte das células afetadas (HE et al., 2009).

Alguns outros ensaios foram feitos durante este projeto, porém não foram incluídos. A perda de expressão de transgenes pode ocorrer caso seu promotor sofra metilação, o que é especialmente comum em ilhas de CpG. O promotor E2F-1 contém sequências ricas em CpG (sítios Sp-1) que poderiam sofrer metilação quando introduzido na célula. Então pensamos na utilização da 5-azacitidina (5aza), conhecida por inibir metilação do DNA. Para isso foi feito um ensaio de transdução com os 6 vírus e o 5-aza foi adicionado. A análise de eGFP revelou, quando comparada com as amostras sem 5-aza, que não teve diferença na expressão do gene repórter.

Outro ensaio feito foi utilizando uma linhagem de HT1080 que apresentava o receptor de estrógeno e o E2F-1 fundidos (HAERE2F) (STRAUSS et al., 2006). O receptor de estrógeno inativo se encontra no citoplasma. Quando a célula é exposta ao ligante, estrógeno, a ligação entre estrógeno e seu receptor provoca uma mudança na conformação protéica, permitindo que este complexo transloque para o núcleo. Uma vez dentro do núcleo, o receptor de estrógeno interage diretamente com DNA e ativa a transcrição de genes alvos. Assim a fusão entre ER modificado e E2F-1 cria uma única proteína e na prática, na ausência do ligante, nesse caso OHT (4-hidroxitamoxifeno) a proteína ERE2F-1 ficará no citoplasma e E2F-1 não tem efeito na célula e na presença do ligante, OHT, essa proteína migra para o núcleo e E2F-1 pode agir como fator de transcrição, ativando a expressão de promotores gênicos, incluindo o promotor do gene E2F-1. Na prática, as células HT1080, HT1080-ERHA-1, HT1080-ERE2F-1, HT1080-ERE2F-2 e HT1080-ERE2F-3 foram transduzidas com o AAVCMV-LIG, AAVE2F-LIG, AAVE2F β -LIG e após 48h foram tratadas com OHT. A análise de Luciferase não mostrou uma mudança considerável na expressão desse transgene quando comparado com a linhagem parental, que apresentou alta expressão de Luciferase.

Também foi realizado um ensaio de RT-PCR para a detecção do transcrito viral. Porém, este ensaio foi realizado com cDNA total (gerado com iniciadores randômicos e não poli-dT) e, possivelmente, a presença do genoma viral poderia ter resultado na amplificação

de uma banda. Se tivéssemos a oportunidade, o ensaio poderia ser repetido com algumas modificação, como tratamento do RNA com DNase e síntese do cDNA utilizando poli-dT como iniciador.

Constatamos o bom funcionamento do gene TK no vetor AAVCMV-TK. A expressão foi detectada por IMF e sua função foi validada através dos ensaios com GCV, mostrando a morte celular das células transduzidas com o vetor AAVCMV-TKIG na presença do fármaco. Também observamos o efeito bystander quando a transdução de apenas 10% de células com TK resultou na morte de aproximadamente 70% das células na cultura. Assim, o vetor AAVCMV-TKIG demonstrou alta expressão dos transgenes, podendo ser uma ferramenta para ser explorada futuramente.

Os vetores AAVCMV-LIG e AAVCMV-TKIG podem ser úteis tanto em ensaios de tratamento do tumor quanto em captura de imagem de tumores. Atualmente a utilização de TK para observação de imagem tumoral *in vivo*, vem sendo estudada. O grupo de Miletic utilizou um vetor retroviral para o tratamento de glioma. Células da medula óssea foram transduzidas com esse vetor retroviral expressando o gene timidina quinase e eGFP e seguidas por PET e ressonância magnética. O efeito terapêutico foi demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, pelas células expressando o TK através do efeito bystander, sendo eficiente no tratamento do glioma (MILETIC et al., 2007). Além disso, este trabalho demonstra que células podem servir como veículos para a introdução de genes terapêuticos. Dessa maneira, futuramente, durante um processo cirúrgico as células do tumor poderiam ser totalmente retiradas ou sem intervenção cirúrgica a atividade celular poderia ser observada.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, a expressão a partir dos vetores com promotor E2F-1 não foi observada de forma adequada para indicar sua aplicação em futuros ensaios. Se for de interesse do nosso laboratório, alternativas para o promotor E2F-1 serão investigadas. Entretanto, a expressão a partir dos vetores AAVCMV-LIG e AAVCMV-TKIG foi comprovada. Estes vetores poderão ser utilizados em futuros ensaios para tratamento e visualização de tumores.

- **Construção dos vetores AAVr**

6 vetores foram construídos durante este trabalho:

AAVCMV-LIG

AAVE2F-LIG

AAVE2F β -LIG

AAVCMV-TKIG

AAVE2F-TKIG

AAVE2F β -TKIG

- **Produção e titulação de estoques virais**

A produção viral foi realizada com sucesso. Foi utilizada somente a produção em pequena escala, contudo, a produção em maior escala seguida por purificação do vírus poderia ter facilitado a titulação.

Um método de titulação por PCR em tempo real foi estabelecido em nosso laboratório e utilizado neste trabalho, permitindo o cálculo do MOI.

- **Caracterização funcional dos vetores em cultura de células**

AAVCMV-LIG: Este vetor apresentou um bom desempenho, os resultados demonstraram a expressão desse vetor em ensaios de transfecção e transdução de HT1080 e também na transfecção de 293T.

AAVCMV-TKIG: Este vetor apresentou um ótimo desempenho, os resultados demonstraram a uma alta expressão do gene repórter e também atividade funcional de TK.

AAVE2F-LIG, AAVE2F β -LIG, AAVE2F-TKIG: Estes vetores não apresentaram um bom desempenho, os resultados não demonstraram a expressão desses vetores nos ensaios de transfecção e transdução de HT1080 e também na transfecção de 293T.

AAVE2F β -TKIG: Este vetor apresentou uma baixa expressão nos ensaios com genes repórter e o ensaio de IMF foi consistente com essa observação, mostrando a dificuldade de encontrar uma célula TK-positiva.

REFERÊNCIAS ¹

AMADO, D. et al. Safety and Efficacy of Subretinal Readministration of a Viral Vector in Large Animals to Treat Congenital Blindness. **Sci Transl Med**, v.2, p. 1-10, 2010.

ANDERSON, W. F. Human gene therapy. **Nature**, v. 392, p. 25-30, 1998.

ATCHISON, R. W.; CASTO, B. C.; HAMMON, W. M. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. **Science**, v. 149, p. 754-756, 1965.

BAINBRIDGE, J. W.; ALI, R. R. Success in sight: The eyes have it! Ocular gene therapy trials for LCA look promising. **Gene Ther**, v. 15, p. 1191-1192, 2008.

BI, W. L.; PARYSEK, L. M.; WARNICK, R.; STAMBROOK, P. J. In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. **Hum Gene Ther**, v. 4, p. 725-731., 1993.

BLAU, L.; MENEGON, R. F.; CHENG, M. C. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. **Quim. Nova**, v. 29, p. 1307-1317, 2006.

BRITO, L.; AMIJI, M. Nanoparticulate carriers for the treatment of coronary restenosis. **Int J Nanomedicine**, v. 2, p. 143-161, 2007.

CHANG, P. L. (1995). Somatic Gene Therapy (Boca Raton, FL, CRC Press, Inc.).

CHEN, H. Z.; TSAI, S. Y.; LEONE, G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. **Nat Rev Cancer**, v. 9, p. 785-797, 2009.

CIDECIYAN, A. V. et al. Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. **Hum Gene Ther**, v. 20, p. 999-1004, 2009.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CULVER, K. W. et al. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. **Science**, v. 256, p. 1550-1552., 1992.

DAYA, S.; BERNIS, K. I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, p. 583-593, 2008.

DEGREVE, B. et al. Differential intracellular compartmentalization of herpetic thymidine kinases (TKs) in TK gene-transfected tumor cells: molecular characterization of the nuclear localization signal of herpes simplex virus type 1 TK. **J Virol**, v. 72, p. 9535-9543, 1998.

DENTI, M. A. et al. Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, p. 3758-3763, 2006.

EL-DEIRY, W. S. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v. 75, p. 817-825, 1993.

FLOTTE, T. R. et al. Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. **Hum Gene Ther**, v. 14, p. 1079-1088, 2003.

GONCALVES, M. A. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. **Virol J**, v. 2, p. 43, 2005.

HE, L. F. et al. Suppression of cancer growth in mice by adeno-associated virus vector-mediated IFN-beta expression driven by hTERT promoter. **Cancer Lett**, v. 286, p. 196-205, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é câncer?**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> acesso em: 10 jan. 2010.

JOHN WILEY. **Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials**. Reino Unido, c 2009. Disponível em: <<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

JOHNSON, L. et al. Selectively replicating adenoviruses targeting deregulated E2F activity are potent, systemic antitumor agents. **Cancer Cell**, v. 1, p. 325-337, 2002.

LI, C. et al. Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy. **Cancer Gene Ther**, v. 12, p. 913-925, 2005a.

LI, Y. et al. Dual promoter-controlled oncolytic adenovirus CG5757 has strong tumor selectivity and significant antitumor efficacy in preclinical models. **Clin Cancer Res**, v. 11, p. 8845-8855, 2005b.

LODISH, H. et al. **Molecular cell biology**. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co, 1999

LU, Y. Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review. **Stem Cells Dev**, v. 13, p. 133-145, 2004.

LUO, C. et al. Intercellular trafficking and cytotoxicity of recombinant HSV-1 thymidine kinase fused with HSV-2 US11 RXP repeat peptide. **Virus Genes**, v. 34, p. 263-272, 2007.

MAGUIRE, A. M. et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. **Lancet**, v. 374, p. 1597-1605, 2009.

MAGUIRE, A. M. et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. **N Engl J Med**, v. 358, p. 2240-2248, 2008.

MANNO, C. S. et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. **Nat Med**, v. 12, p. 342-347, 2006.

MARIA, B. L.; FRIEDMAN, T. Gene therapy for pediatric brain tumors. **Semin Pediatr Neurol**, v. 4, p. 333-339, 1997.

MARTINEZ-SALAS, E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. **Curr Opin Biotechnol**, v. 10, p. 458-464, 1999.

MILETIC, H. et al. Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene. **Mol Ther**, v. 15, p. 1373-1381, 2007.

MILLER, D. G. et al. Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. **J Virol**, v. 79, p. 11434-11442, 2005.

MINATO, Y. et al. Involvement of E2F in cellular proliferation by regulating growth factor receptor expression. In: YOSHIDA, K. (Ed.). **Control of cellular physiology by E2F transcription factors**. Kerala: Research Signpost, 2008. p. 153-165.

MONFARED, P. et al. Noninvasive assessment of E2F-1-mediated transcriptional regulation in vivo. **Cancer Res**, v. 68, p. 5932-5940, 2008.

NEUMAN, E. et al. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter.[erratum appears in Mol Cell Biol 1995 Aug;15(8):4660]. **Molecular & Cellular Biology**, v. 14, p. 6607-6615, 1994.

PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A. O Genoma Humano e o Câncer. In: ROCHA, J. C.; FERREIRA, C. G. (Ed.). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 3-11.

PIROZZI, M. et al. Intramuscular viral delivery of paraplegin rescues peripheral axonopathy in a model of hereditary spastic paraplegia. **J Clin Invest**, v. 116, p. 202-208, 2006.

PLAUTZ, G.; NABEL, E. G.; NABEL, G. J. Selective elimination of recombinant genes in vivo with a suicide retroviral vector. **New Biol**, v. 3, p. 709-715., 1991.

PORTSMOUTH, D.; HLAVATY, J.; RENNER, M. Suicide genes for cancer therapy. **Mol Aspects Med**, v. 28, p. 4-41, 2007.

RYAN, P. C. et al. Antitumor efficacy and tumor-selective replication with a single intravenous injection of OAS403, an oncolytic adenovirus dependent on two prevalent alterations in human cancer. **Cancer Gene Ther**, v. 11, p. 555-569, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, p. 103-112, 2002.

STRAUSS, B. et al. Retroviral transfer of the p16INK4a cDNA inhibits C6 glioma formation in Wistar rats. **Cancer Cell Int**, v. 2, p. 2, 2002.

STRAUSS, B. E.; PATRICIO, J. R.; DE CARVALHO, A. C.; BAJGELMAN, M. C. A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: a potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 348, p. 1411-1418, 2006

STRAUSS, B. E. Transcriptional control strategies in gene therapy vectors. In : XIANG, J. (Ed.). **Recent Development in Gene Therapy**. Kerala: Research Network, 2007. p. 23-52.

STRAUSS, B. E. et al. Therapeutic opportunities offered by E2F pathway. In: YOSHIDA, K. (Ed.). **Control of cellular physiology by E2F transcription factors**. Kerala: Research Signpost, 2008. p. 368-399

STRAUSS, B. E.; COSTANZI-STRAUSS, E. Terapia Gênica. In: ROCHA, J. C.; FERREIRA, C. G. (Ed.). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 437-446.

TANEJA, P. et al. Control of cellular physiology by transcription factors E2F and their roles in carcinogenesis. In: YOSHIDA, K. (Ed.). **Control of cellular physiology by E2F transcription factors**. Kerala: Research Signpost, 2008. p. 179-197.

TESSEMA, M.; LEHMANN, U.; KREIPE, H. Cell cycle and no end. **Virchows Arch**, v.444, p. 313-323, 2004.

TSUKUDA, K. et al. An E2F-responsive replication-selective adenovirus targeted to the defective cell cycle in cancer cells: potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell. **Cancer Res**, v. 62, p. 3438-3447, 2002.

UHRBOM, L.; NERIO, E.; HOLLAND, E. C. Dissecting tumor maintenance requirements using bioluminescence imaging of cell proliferation in a mouse glioma model. **Nat Med**, v. 10, p. 1257-1260, 2004.

ZAISS, A. K.; MURUVE, D. A. Immune responses to adeno-associated virus vectors. **Curr Gene Ther**, v. 5, p. 323-331, 2005.

ZHANG, Y. A. et al. Antitumor activity of an oncolytic adenovirus-delivered oncogene small interfering RNA. **Cancer Res**, v. 66, p. 9736-9743, 2006.

ANEXOS

ANEXO A - Mapa do vetor pAAV-MCS da Stratagene

left inverted terminal repeat 1–141
 CMV promoter 150–812
 β -globin intron 820–1312
 multiple cloning site 1319–1394
 hGH polyA 1395–1873
 right inverted terminal repeat 1913–2053
 f1 origin 2145–2451
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 2970–3827
 pUC origin 3978–4645

*Non-unique sites used to release the expression cassette

pAAV-MCS Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 1319–1394)

ANEXO B - Mapa do vetor pIRES2-EGFP da Clonetch

ANEXO C - Mapa do vetor AAVCMV-IpG

ANEXO D - Mapa de restrição para confirmar o vetor AAVCMV-IpG

Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando as respectivas bandas correspondentes ao vetor AAVCMV-IpG. 1) Padrão λ HIII; 2) vetor cortado com *Bam*HI e *Not*I; 3) vetor cortado com *Bam*HI; 4) vetor cortado com *Not*I.

ANEXO E - Mapa do vetor FE2FLIGW

ANEXO F - Mapa do vetor AAVCMV-LIG

ANEXO G - Mapa do vetor AAVE2F-LIG

ANEXO H - Mapa do vetor pCLTK

ANEXO I - Mapa do vetor AAVCMV-TKIG

ANEXO J - Mapa do vetor AAVE2F-TKIG

ANEXO K - Mapa do vetor AAVE2F β -LIG

ANEXO L - Mapa do vetor AAVE2F β -TKIG